

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 03 649 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 196 03 649.6
⑳ Anmeldetag: 1. 2. 96
㉑ Offenlegungstag: 7. 8. 97

⑤① Int. Cl.⁸:
C07 K 14/245
A 61 K 38/16
C 12 N 15/70
C 12 N 15/31
C 12 N 1/21
C 12 N 15/75
// (C12N 1/21, C12R
1:19)

DE 196 03 649 A 1

⑦① Anmelder:
Lubitz, Werner, Prof. Dr., Wien, AT; Sleytr, Uwe,
Prof. Dr., Wien, AT

⑦④ Vertreter:
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑦② Erfinder:
Lubitz, Werner, Prof. Dr., Wien, AT; Sleytr, Uwe,
Prof. Dr., Wien, AT; Kuen, Baetrix, Dr., Wien, AT

⑤④ Rekombinante Expression von S-Layer-Proteinen

⑤⑦ Die Erfindung betrifft Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen in gram-negativen Wirtszellen. Weiterhin werden die Nukleotidsequenz eines neuen S-Layer-Gens und Verfahren zur Herstellung modifizierter S-Layer-Proteine offenbart.

DE 196 03 649 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen und modifizierten S-Layer-Proteinen in gram-negativen Wirtszellen.

5 Kristalline bakterielle Zelloberflächenlayer (S-Layer) bilden in vielen Eubakterien und den allermeisten Archaeobakterien die äußerste Zellwandkomponente (Sleytr et al. (1988), Crystalline Bacterial Cell Surface Layers, Springer Verlag Berlin; Messner und Sleytr, Adv. Mikrob. Physiol. 33 (1992), 213—275). Die meisten der gegenwärtig bekannten S-Layer-Proteine sind aus identischen Proteinen bzw. Glykoproteinen zusammengesetzt, die scheinbare Molekulargewichte im Bereich von 40 000 bis 220 000 aufweisen. Die Komponenten von
10 S-Layern sind selbst-assemblierend und die meisten Gitter haben eine schräge (p2), quadratische (p4) oder hexagonale (p6) Symmetrie. Die Funktionen von bakteriellen S-Layern sind immer noch nicht vollständig bekannt, aber aufgrund ihrer Lokalisierung an der Zelloberfläche dürften die porösen kristallinen S-Layer hauptsächlich als Schutzhüllen, Molekularsiebe oder zur Förderung der Zelladhäsion und Oberflächenerkennung dienen.

15 Genetische Daten und Sequenzinformationen sind für verschiedene S-Layer-Gene aus Mikroorganismen bekannt. Eine Übersicht findet sich bei Peyret et al., Mol. Mikrobiol. 9 (1993), 97—109. Auf diese Daten wird ausdrücklich Bezug genommen. Die Sequenz des für das S-Layer-Protein von *B.stearothermophilus* PV72 kodierenden Gens *sbsA* und ein Verfahren zu dessen Klonierung sind bei Kuen et al. (Gene 145 (1994), 115—120) angegeben.

20 *B.stearothermophilus* PV72 ist ein gram-positives Bakterium, das mit einem hexagonal angeordneten S-Layer bedeckt ist. Die Hauptkomponente des S-Layer ist ein 128 kd-Protein, bei dem es sich um das häufigste Protein in der Zelle mit einem Anteil von ungefähr 15% bezüglich der gesamten Proteinbestandteile handelt. Es sind verschiedene Stämme von *B.stearothermophilus* charakterisiert worden, die hinsichtlich des Typs von S-Layer-Gitter, dem Molekulargewicht und der Glykosylierung der S-Layer-Komponenten unterschiedlich sind (Messner und Sleytr (1992), supra).

25 Die deutsche Patentanmeldung P 44 25 527.6 offenbart den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt des S-Layer-Gens aus *B.stearothermophilus* und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Spaltstelle zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Protein befindet sich zwischen Position 30 und 31 der Aminosäuresequenz. Die Signalpeptid-kodierende Nukleinsäure kann operativ mit einer Protein-kodierenden Nukleinsäure verknüpft werden und zur rekombinanten Herstellung von Proteinen in einem Verfahren verwendet werden, bei dem man eine transformierte Wirtszelle bereitstellt, die die Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung und Sekretion des davon kodierten Polypeptids führen, und das resultierende Polypeptid aus dem Kulturmedium gewinnt. Als Wirtszellen werden vorzugsweise prokaryontische Organismen, insbesondere gram-positive Organismen der Gattung *Bacillus* genannt.

35 Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die rekombinante Herstellung von S-Layer-Proteinen nicht nur in gram-positiven prokaryontischen Wirtszellen, sondern auch in gram-negativen prokaryontischen Wirtszellen möglich ist. Dabei bildet sich das S-Layer-Protein im Inneren der Wirtszelle nicht in Form von ungeordneten Einschlußkörpern, sondern unerwarteterweise in Form von geordneten monomolekularen Schichten.

40 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man (a) eine gram-negative prokaryontische Wirtszelle bereitstellt, die transformiert ist mit einer für ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure, ausgewählt aus (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt, (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt; (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen und (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle gewinnt.

50 Unter dem Begriff "stringente Hybridisierung" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man, daß eine Hybridisierung auch nach waschen bei 55°C, vorzugsweise 60°C, in einem wäßrigen Niedrigsalz-Puffer (z. B. 0,2 xSSC) noch auftritt (s. auch Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A. Laboratory Manual).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in gram-negativen prokaryontischen Wirtszellen durchgeführt. Dabei wird überraschenderweise im Zellinneren eine geordnete S-Layer-Proteinstruktur erhalten. Vorzugsweise werden als Wirtszellen Enterobakterien, insbesondere *E. coli*, verwendet. Besonders bevorzugt ist der *E. coli*-Stamm pop2125, der am 31.01.1996 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder weg 1b, D 38124 Braunschweig unter dem Aktenzeichen DSM 10509 hinterlegt wurde.

60 Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zur Gewinnung rekombinanter S-Layer-Proteine eingesetzt werden. Hierzu verwendet man eine für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure, die eine oder mehrere Insertionen enthält, die für Peptid- oder Polypeptidsequenzen kodieren. Diese Insertionen können einerseits nur für Peptide mit wenigen Aminosäuren, z. B. 1—25 Aminosäuren, kodieren. Andererseits können die Insertionen auch für größere Polypeptide von z. B. bis zu 1000 Aminosäuren und vorzugsweise bis zu 500 Aminosäuren kodieren, ohne daß die Fähigkeit des S-Layer-Proteins zur Ausbildung einer korrekt gefalteten Struktur verlorengelht. Neben den Insertionen kann das rekombinante S-Layer-Protein auch Aminosäuresubstitutionen, insbesondere Substitutionen einzelner Aminosäuren im Bereich der Insertionsorte sowie gegebenenfalls Deletionen einzelner Aminosäuren oder kurzer Aminosäureabschnitte von bis zu 30 Aminosäuren aufweisen.

65 Als insertionsstellen für Polypeptid-kodierende Sequenzen bevorzugt sind Bereiche zwischen den Positionen 1—1200 und 2200—3000 der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz. Besonders bevorzugte insertionsstellen sind die *NruI*-Schnittstelle an Position 582, die *PvuII*-Schnittstelle an Position 878, die *SnaB*-I-Schnittstel-

le an Position 917, die PvuII-Schnittstelle an Position 2504 und die PvuII-Schnittstelle an Position 2649. Die Insertion einer für Streptavidin kodierenden Nukleinsäuresequenz konnte bereits in die NruI-Schnittstelle an Position 581 gezeigt werden.

Die Peptid- oder Polypeptid-kodierenden Insertionen werden vorzugsweise ausgewählt aus Nukleotidsequenzen, die für Cysteinreste, Bereiche mit mehreren geladenen Aminosäuren, z. B. Arg, Lys, Asp oder Glu, oder Tyr-Resten, DNA-bindende Epitope, antigene, allergene oder immunogene Epitope, metallbindende Epitope, Streptavidin, Enzyme, Cytokine oder Antikörper-bindende Proteine kodieren.

Ein besonders bevorzugtes Beispiel für eine Insertion in die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ist eine für Streptavidin kodierende Nukleotidsequenz. Auf diese Weise können universelle Trägermoleküle erhalten werden, die zur Ankopplung von biotinylierten Reagenzien und zum Nachweis in immunologischen oder Hybridisierungstestverfahren geeignet sind.

Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für Insertionen sind antigene, allergene oder immunogene Epitope, z. B. Epitope aus pathogenen Mikroorganismen, wie etwa Bakterien, Pilzen, Parasiten etc. und Viren, oder Epitope aus Pflanzen oder Epitope gegen körpereigene Substanzen, z. B. Cytokine, sowie gegen Toxine, insbesondere Endotoxine. Besonders bevorzugte Beispiele für immunogene Epitope sind Epitope aus Herpesviren, wie etwa Herpesvirus 6 oder Pseudorabiesvirus (Lomniczi et al., J. Virol. 49 (1984), 970—979), insbesondere Epitope aus den Genen gB, gC oder/und gD, oder Maul- und Klauenseuchevirus (FMDV), insbesondere Epitope aus den Genabschnitten, die für VP1, VP2 oder/und VP3 kodieren. Die immunogenen Epitope können so ausgewählt werden, daß sie die Erzeugung einer Antikörpervermittelten Immunreaktion fördern oder/und die Erzeugung einer zellulären Immunreaktion, z. B. durch Stimulation von T-Zellen, fördern. Beispiele für geeignete allergene Epitope sind Birkenpollenallergene, z. B. Bet v I (Ebner et al., J. Immunol. 150 (1993) 1047—1054). weiterhin besonders bevorzugt sind antigene Epitope, die in der Lage sind, aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten körpereigene oder körperfremde Substanzen wie etwa Cytokine oder Toxine zu binden und herauszufiltrieren. Derartige Epitope können Bestandteile von Cytokin- oder Toxinrezeptoren oder von Antikörpern gegen Cytokine oder Toxine umfassen.

Andererseits können die Insertionen auch für Enzyme kodieren. Bevorzugte Beispiele sind Enzyme zur Synthese von Polyhydroxybuttersäure, z. B. PHB-Synthase. Durch Einbau von PHB-Synthase in den S-Layer kann bei Zufuhr des Substrats Hydroxybuttersäure unter geeigneten Bedingungen eine molekulare Spinndüse entstehen. Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für ein Enzym ist bakterielle Luciferase. Hier kann bei Zufuhr des Enzymsubstrats, eines Aldehyds, und in Anwesenheit von O₂ ein molekularer Laser erhalten werden.

Ebenfalls bevorzugt sind Insertionen, die für Cytokine, wie etwa Interleukine, Interferone oder Tumornekrosefaktoren kodieren. Diese Moleküle können beispielsweise in Kombination mit immunogenen Epitopen zur Herstellung von Vakzinen verwendet werden.

Schließlich sind auch Insertionen bevorzugt, die für Antikörper-bindende Proteine, wie etwa Protein-A oder Protein-G oder für DNA- oder/und metallbindende Epitope, wie etwa Leucin-Zipper, Zinkfinger etc. kodieren.

Vorzugsweise wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure in operativer Verknüpfung mit einer für ein Signalpeptid von gram-positiven Bakterien kodierenden Nukleinsäure verwendet, d. h. 5'-seitig von der S-Layer-Protein-kodierenden Nukleinsäure ist die Signalpeptid-kodierende Nukleinsäure angeordnet. Überraschenderweise wurde nämlich festgestellt, daß die Anwesenheit derartiger Signalpeptidsequenzen, die in den erfindungsgemäß verwendeten gram-negativen Wirtszellen nicht abgespalten werden, die Stabilität der S-Layer-Strukturen verbessern kann. Besonders bevorzugt umfaßt die für das Signalpeptid kodierende Nukleinsäure (a) den signalpeptid-kodierenden Abschnitt der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Nukleotidsequenz, (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder/und (c) eine zu den Sequenzen aus (a) oder/und (b) mindestens 80% und insbesondere mindestens 90% homologe Nukleotidsequenz.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein rekombinantes S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt, (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

In SEQ ID NO. 1 ist die kodierende Nukleotidsequenz des S-Layer-Gens sbsA aus *B. stearothermophilus* einschließlich des Signalpeptid-kodierenden Abschnitts gezeigt. Der Signalpeptidkodierende Abschnitt reicht von Position 1—90 der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz. Der für das reife SbsA-Polypeptid kodierende Abschnitt reicht von Position 91—3684.

Das sbsA-Gen von *B. stearothermophilus* kodiert für ein Protein mit insgesamt 1228 Aminosäuren einschließlich eines N-terminalen Signalpeptids mit 30 Aminosäuren (SEQ ID NO. 2). Die Spaltstelle zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Protein befindet sich zwischen Position 30 und 31 der Aminosäuresequenz. Das Signalpeptid weist eine basische aminoterminal Domäne, gefolgt von einer hydrophoben Domäne, auf.

Sequenzvergleiche mit anderen Signalpeptiden zeigen eine gewisse Homologie zu Signalpeptiden von extrazellulären Proteinen in Bazillen, wie etwa alkalische Phosphatase und neutrale Phosphatase von *B. amyloliquefaciens* (Vasantha et al., J. Bacteriol. 159 (1984), 811—819) sowie mit den Signalpeptiden für das *B. sphaericus*-Gen 125 (Bowditch et al., J. Bact. 171 (1989), 4178—4188) und das OWP-Gen von *B. brevis* (Tsuboi et al., J. Bacteriol. 168 (1986), 365—373).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinanter Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Der Vektor ist vorzugsweise in Prokaryonten replizierbar. Besonders bevorzugt ist der Vektor ein prokaryontisches Plasmid.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einer Nukleinsäure oder

inem rekombinanten Vektor gemäß vorliegender Erfindung transformiert ist. Vorzugsweise ist die Zelle ein gram-negativer prokaryontischer Organismus und am meisten bevorzugt eine *E. coli*-Zelle. Verfahren zur Transformation von Zellen mit Nukleinsäuren sind allgemeiner Stand der Technik (siehe Sambrook et al, supra) und brauchen daher nicht erläutert zu werden.

5 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinantes S-Layer-Protein, das innerhalb der in SEQ ID NO. 2 gezeigten Aminosäuresequenz mindestens eine Peptidoder/und Polypeptidinsertion enthält. Bevorzugte Beispiele für Peptid- und Polypeptidinsertionen wurden bereits erläutert.

Aus erfindungsgemäßen rekombinanten S-Layer-Proteinmolekülen kann eine rekombinante S-Layer-Struktur assembliert werden, die als Untereinheit mindestens ein erfindungsgemäßes rekombinantes S-Layer-Protein enthält. Weiterhin ist bevorzugt, daß die erfindungsgemäße S-Layer-Struktur als "Verdünnungsmoleküle" auch nichtmodifizierte S-Layer-Proteine enthält. Die nichtmodifizierten S-Layer-Proteine liegen vorzugsweise in einem molaren Anteil von 10–99% bezüglich der gesamten S-Layer-Proteine vor.

Die erfindungsgemäße S-Layer-Struktur kann mehrere kovalent oder durch Affinitätsbindung miteinander verknüpfte Schichten umfassen. Kovalente Verknüpfungen können beispielsweise durch Insertionen von Cysteinresten und einer anschließenden Ausbildung von Cystinbrücken eingeführt werden. Verknüpfungen durch Affinitätsbindung umfassen beispielsweise Antikörper-Antigen-, Antikörper-Protein A- bzw. -Protein G- oder Streptavidin-Biotin-Wechselwirkungen.

S-Layer-Strukturen, die rekombinante S-Layer-Proteine enthalten, können gegebenenfalls auch in trägergebundener Form hergestellt werden. Hierzu kann die Reassemblierung der S-Layer-Struktur aus einzelnen Einheiten in Gegenwart eines Peptidoglycanträgers erfolgen, wobei beispielsweise Peptidoglycanschichten erzeugt werden, die auf einer oder auf beiden Seiten mit einer S-Layer-Struktur überzogen sind. Eine andere Möglichkeit zur Herstellung trägergebundener S-Layer-Strukturen besteht darin, eine S-Layer-Schicht an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien, z. B. wasser/Luft, zu erzeugen und diese Schicht auf einer Festphase, z. B. einer Filtermembran, zu immobilisieren (vgl. z. B. Pum und Sleytr (1994), Thin Solid Films 244, 882–886; Küpcü et al. (1995), Biochim. Biophys. Acta 1235, 263–269).

Die erfindungsgemäßen rekombinanten S-Layer-Proteine und S-Layer-Strukturen sind für eine Vielzahl von Anwendungen geeignet. Besonders bevorzugt ist die Verwendung als Vakzin oder Adjuvans, wobei man rekombinante S-Layer-Proteine verwendet, die immunogene Epitope von Pathogenen und/oder körpereigene immunstimulierende Polypeptide, wie etwa Cytokine, enthalten. Bei dieser Anwendung ist nicht unbedingt eine Reinigung der rekombinanten S-Layer-Proteine erforderlich. Statt dessen kann beispielsweise die Verwendung in Kombination mit einem Bakterienghost erfolgen, der ggf. in seiner Membran zusätzliche immunogene Epitope enthält.

Die Herstellung geeigneter "Bakterienghosts" ist beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP91/00967 beschrieben, auf die hiermit Bezug genommen wird. Dort werden modifizierte Bakterien offenbart, erhältlich durch Transformation eines gram-negativen Bakteriums mit dem Gen eines lytisch wirkenden Membranproteins aus Bakteriophagen, mit dem Gen eines lytisch wirkenden Toxin-Freisetzungspoteins oder mit Genen, die Teilsequenzen davon, die für lytische Proteine kodieren, enthalten, Kultivierung des Bakteriums, Expression dieses Lyse-Gens und Isolierung des resultierenden Bakterienghosts aus dem Kulturmedium.

40 An die Membran dieser Bakterien kann, wie im europäischen Patent 0 516 655 beschrieben, ein rekombinantes Protein gebunden sein, das durch Expression einer rekombinanten DNA in diesen gram-negativen Bakterien erhältlich ist. Diese rekombinante DNA umfaßt eine erste DNA-Sequenz, welche für eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne, die eine α -helikale Struktur besitzt und aus 14-20 Aminosäuren besteht, die N- und C-terminal von je 2-30 beliebigen Aminosäuren flankiert sein können, kodiert. Mit dieser ersten DNA-Sequenz in operativer Verknüpfung befindet sich eine zweite DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes rekombinantes Protein kodiert. Weiterhin enthält das gram-negative Bakterium eine dritte DNA-Sequenz, die unter einer von den ersten und zweiten DNA-Sequenzen getrennten Kontrolle steht und für in lytisch wirkende s Membranprotein aus Bakteriophagen oder ein lytisch wirkendes Toxin-Freisetzungspotein oder für deren lytisch wirkende Teile kodiert. Durch Expression und Lyse derartiger rekombinanter, gram-negativer Bakterien werden sog. "Bakterienghosts" erhalten, die eine intakte Oberflächenstruktur mit an die Oberfläche gebundenen immunogenen Epitopen enthalten.

Bei Kombination dieser Baktienghosts mit erfindungsgemäßen rekombinanten S-Layern können Vakzine und Adjuvantien erzeugt werden, die besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen.

Es wurde festgestellt, daß das gram-positive Bakterium *B.stearothermophilus* PV72 neben SbsA noch ein weiteres S-Layer-Protein enthält, das in der Folge als SbsB bezeichnet wird. (Sara und Sleytr (1994), J. Bacteriol. 176, 7182–7189). Durch Amplifikation unter Verwendung geeigneter Nukleinsäureprimer konnte das sbsB-Gen isoliert und charakterisiert werden. In SEQ ID NO. 5 ist die kodierende Nukleotidsequenz des S-Layer-Gens sbsB aus *B.stearothermophilus* einschließlich des Signalpeptid-kodierenden Abschnitts, der von Position 1–93 der Nukleinsäuresequenz reicht, gezeigt. In SEQ ID NO. 6 ist die davon abgeleitete Aminosäuresequenz gezeigt. Das sbsB-Gen kodiert für ein Protein mit insgesamt 921 Aminosäuren einschließlich eines N-terminalen Signalpeptids mit 31 Aminosäuren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus

- 65 (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechend Nukleotidsequenz umfaßt, und

(iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

Ebenso wie beim sbsA-Gen kann auch beim sbsB-Gen innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine für ein Peptid oder Polypeptid kodierende Nukleinsäureinsertion eingefügt werden. Bezüglich bevorzugter Beispiele für Insertionen im sbsB-Gen wird auf die zuvor gemachten Ausführungen hinsichtlich des sbsA-Gens verwiesen.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie eines sbsB-Gens gegebenenfalls mit Insertion enthält. Dieser Vektor kann in Eukaryonten, Prokaryonten oder in Eukaryonten und Prokaryonten replizierbar sein. Er kann in ein das Genom der Wirtszelle integrierbarer Vektor oder ein Vektor sein, der extrachromosomal vorliegt. Vorzugsweise ist der erfindungsgemäße Vektor ein Plasmid, insbesondere ein prokaryontisches Plasmid.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einem sbsB-Gen transformiert ist, wobei das sbsB-Gen gegebenenfalls eine Insertion enthalten kann. Die Wirtszelle kann sowohl eine eukaryontische als auch eine prokaryontische Zelle sein. Vorzugsweise ist die Zelle ein prokaryontischer Organismus. Sowohl gram-positive Organismen, z. B. Organismen der Gattung *Bacillus*, als auch gram-negative Organismen, wie etwa Enterobakterien, insbesondere *E. coli*, sind bevorzugt. Verfahren zur Transformation von eukaryontischen und prokaryontischen Zellen mit Nukleinsäuren sind bekannt und brauchen daher nicht ausführlich erläutert werden.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein SbsB-Protein, d. h. ein S-Layer-Protein, das von einer Nukleinsäure, wie vorstehend definiert kodiert ist. Besonders bevorzugt sind rekombinante SbsB-Proteine, die eine oder mehrere Peptidoder/und Polypeptidinsertionen innerhalb der sbsB-Sequenz enthalten. Besonders bevorzugt weist der SbsB-Anteil eines erfindungsgemäßen Polypeptids eine Homologie von mindestens 80% und insbesondere mindestens 90% zu der in SEQ ID NO. 6 gezeigten Aminosäuresequenz auf.

Auch aus den rekombinanten SbsB-S-Layer-Proteinmolekülen kann eine rekombinante S-Layer-Struktur entsprechend der rekombinanten SbsA-S-Layer-Struktur assembliert werden. In dieser Struktur liegen die nichtmodifizierten S-Layerproteine vorzugsweise in einem molaren Anteil von 10–99% bezüglich der gesamten S-Layer-Proteine vor.

Auch die Anwendungen der erfindungsgemäßen rekombinanten sbsB-S-Layer-Proteine und S-Layer-Strukturen entsprechen den vorstehend für SbsA genannten Anwendungen. Insbesondere ist dabei die Verwendung als Vakzin oder Adjuvans bemerkenswert.

Rekombinante S-Layer-Proteine sind erhältlich durch ein Verfahren, bei dem man

- (a) eine Wirtszelle bereitstellt, die eine für ein S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure enthält, die innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält,
- (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen, und
- (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle oder dem Kulturmedium gewinnt.

In einer ersten bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens wird ein rekombinantes sbsA-S-Layer-Protein hergestellt, d. h. die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure wird ausgewählt aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID No. 1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform wird ein rekombinantes SbsB-S-Layer-Protein hergestellt, d. h. die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure wird ausgewählt aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

Neben den rekombinanten SbsA und SbsB-S-Layer-Proteinen aus *B. stearothermophilus* können jedoch auch rekombinante S-Layer-Proteine aus anderen Organismen (vgl. z. B. Peyret et al., (1993), supra) hergestellt werden.

Die Herstellung der rekombinanten S-Layer-Proteine kann einerseits in einer heterologen Wirtszelle erfolgen, d. h. in einer Wirtszelle, die ursprünglich kein S-Layer-Gen enthält. Beispiele für solche heterologen Wirtszellen sind gram-negative prokaryontische Organismen, wie etwa *E. coli*.

Oft ist jedoch die Herstellung der rekombinanten S-Layer-Proteine in homologen Wirtszellen bevorzugt, d. h. in Wirtszellen, die ursprünglich ein natürliches S-Layer-Gen enthalten. In einer Ausführungsform dieser homo-

gen Expression wird das rekombinante S-Layer-Gen in die Wirtszelle so eingeführt, daß die Wirtszelle noch in der Lage ist, ein weiteres S-Layer-Gen zu exprimieren, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert. Vorzugsweise ist das nichtmodifizierte S-Layer-Protein in der Lage, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden. Ein Beispiel für diese Ausführungsform der homologen Expression ist eine *B. stearothermophilus* PV72 Zelle, welche intakte natürliche *sbsA*- oder/und *sbsB*-Gene enthält, und die mit einem Plasmid transformiert ist, welches ein rekombinantes S-Layer-Gen enthält.

In einer zweiten Ausführungsform kann die homologe Expression in einer Wirtszelle erfolgen, in der das ursprünglich vorhandene intakte S-Layer-Gen inaktiviert wurde. Folglich wird in dieser Ausführungsform in der Wirtszelle kein weiteres S-Layer-Gen mehr exprimiert, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert, welches in der Lage ist, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden. Ein spezifisches Beispiel für eine derartige Wirtszelle ist eine *B. stearothermophilus* PV72 Zelle, in deren Genom z. B. durch homologe Rekombination ein für ein rekombinantes S-Layer-Protein kodierendes Gen eingeführt wurde, welches das ursprüngliche S-Layer-Gen ersetzt. Ein weiterer Beispiel für eine derartige Wirtszelle ist eine *B. stearothermophilus*-Zelle, in der das native S-Layer-Gen z. B. durch ortsspezifische Mutagenese oder/und homologe Rekombination inaktiviert wurde und die mit einem ein rekombinantes S-Layer-Gen enthaltenden Vektor transformiert ist.

Bei der homologen Expression rekombinanter S-Layer-Gene werden als Wirtszellen üblicherweise gram-positive prokaryontische Organismen verwendet. Besonders bevorzugt als Wirtszelle ist *B. stearothermophilus* PV72, der bei hoher Temperatur in einem definierten synthetischen Medium (Schuster et al., (1995), *Biotechnol. and Bioeng.* 48: 66—77) kultiviert werden kann.

Weiterhin wird die vorliegende Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele und Figuren erläutert. Es zeigen: SEQ ID NO. 1 die vollständige Nukleotidsequenz des kodierenden Abschnitts des S-Layer-Gens *sbsA* von *B. stearothermophilus*;

SEQ ID NO. 2 die davon abgeleitete Aminosäuresequenz;

SEQ ID NO. 3 die Nukleotidsequenz des Primers T5-X;

SEQ ID NO. 4 die Nukleotidsequenz des Primers E;

SEQ ID NO. 5 die vollständige Nukleotidsequenz des kodierenden Abschnitts des S-Layer-Gens *sbsB* von *B. stearothermophilus*;

SEQ ID NO. 6 die davon abgeleitete Aminosäuresequenz;

SEQ ID NO. 7 die Nukleotidsequenz eines Teilfragments des Streptavidingens;

SEQ ID NO. 8 die Nukleotidsequenz des Primers NIS 2AG;

SEQ ID NO. 9 die Nukleotidsequenz des Primers LIS C3;

Fig. 1 eine schematische Darstellung des zur Herstellung des rekombinanten Vektors pBK4 verwendeten *sbsA* PCR-Fragments;

Fig. 2 eine schematische Darstellung von Peptidinsertionen in die Aminosäuresequenz des *SbsA* S-Layer-Proteins und

Fig. 3 eine schematische Darstellung von Aminosäuresubstitutionen und -insertionen in rekombinanten S-Layer-Proteinen.

BEISPIELE

1. Bakterienstämme, Medien und Plasmide

Gram-positive Bakterien des Stammes *Bacillus stearothermophilus* PV72 wurden bei 58°C in SVIII-Medium (Bartelmus und Perschak, *Z. Zuckerind.* 7 (1957), 276—281) kultiviert. Bakterien des Stammes *E. coli* pop2135 (*endA*, *thi*, *hsdR*, *malT*, *cl857*, *λpR*, *malPQ*) wurden in LB-Medium kultiviert (Sambrook et al., (1989), *supra*). Zur Selektion von Transformanten wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml dem Medium zugegeben. Das Plasmid pPLCAT10 (*λpL*, *bla*, *colE1*) (Stanssens et al., *Gene* 36 (1985), 211—223) wurde als Klonierungsvektor verwendet.

2. Manipulation von DNA-Fragmenten

Restriktionsanalyse von DNA, Agarosegelelektrophorese und Klonierung von DNA-Fragmenten wurden nach den bei Sambrook et al. (1989), *supra*, beschriebenen Standardmethoden durchgeführt.

Die Transformation von kompetenten Zellen erfolgte durch Elektroporation unter Verwendung eines Bio-Rad Genepulsers (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalif., USA) nach Protokollen des Herstellers.

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (*Nucleic Acids Res.* 7 (1979), 1513—1523) isoliert. Chromosomale DNA wurde gemäß der bei Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology* (1987), New York, John Wiley) beschriebenen Verfahren isoliert.

Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden von Boehringer Mannheim, New England Biolabs oder Stratagene bezogen und gemäß den Vorschriften der Hersteller eingesetzt.

3. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzen der 5'- und 3'-Regionen (einschließlich des für die Signalsequenz kodierenden Bereichs) des Gens *sbsA* im Vektor pPLCAT10 wurde nach der Dideoxykettenterminationsmethode von Sanger et al. bestimmt. Die zur Sequenzierung verwendeten Primer wurden auf Basis der publizierten *sbsA*-Sequenz (Kuen et al., *Gene* 145 (1994), 115—120) konstruiert.

4. PCR-Amplifikation von sbsA

Die PCR-Amplifikation des sbsA-Gens erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 100 µl, in dem 200 µM Deoxynukleotide, 1U Pfu-Polymerase (Stratagene), 1x Pfu-Reaktionspuffer, jeweils 0.5 µM Oligonukleotidprimer und 100 ng genomischer DNA aus *B.stearothermophilus* als Matrize vorhanden waren. Die Amplifikation wurde über 30 Zyklen in einem Thermocycler (Biomed Thermocycler 60) durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus einem Denaturierungsschritt von 1,5 min bei 95°C, einem Annealingschritt von 1 min bei 56°C und 1 min bei 50°C sowie einem Extensionsschritt von 2 min bei 72°C.

Als Primer wurden der im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO. 3 angegebene Primer T5-X, der den 5'-Bereich von sbsA flankiert und eine XbaI-Stelle enthält, sowie der im Sequenzprotokoll in SEQ ID NO. 4 gezeigte Primer E verwendet, der die 20 Nukleotide stromaufwärts gelegene Region des Transkriptionsterminators der sbsA-Sequenz flankiert und eine BamHI-Stelle enthält.

Die PCR-amplifizierten Produkte wurden auf einem 0.8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und zur Klonierung unter Verwendung des Systems von Gene Clean (BIO101 La Jolla, Kalif, USA) zur Klonierung gereinigt.

5. Klonierung des sbsA-Gens in den Vektor pPLcAT10

Das durch PCR gewonnene sbsA-Gen mit einer Länge von 3,79 kb wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und BamHI gespalten. Das resultierende XbaI-BamHI-Fragment wurde in die entsprechenden Restriktionsstellen des Vektors pPLcAT10 kloniert, so daß das sbsA-Gen unter transkriptioneller Kontrolle des stromaufwärts gelegenen pL-Promotors war. Das ATG-Startkodon der sbsA-Sequenz wurde durch die Klonierungsprozedur rekonstruiert. Die klonierte sbsA-Sequenz enthielt die N-terminale Signalsequenz von sbsA und endete 20 nt nach dem Transkriptionsterminator. Nach Ligation der Vektor-DNA mit dem sbsA-Fragment wurde der *E. coli*-Stamm pop2135 durch Elektrottransformation transformiert. Die resultierenden Klone wurden einer DNA-Restriktionsanalyse unterzogen. Ein positiver Klon wurde sequenziert, um die korrekten Sequenzübergänge an den 5'- und 3'-Enden zu verifizieren. Dieser Klon wurde als pBK4 bezeichnet.

Eine schematische Darstellung des 3,79 kb XbaI sbsA-Fragments und seine Lokalisierung in der multiplen Klonierungsstelle des Plasmids pBK4 ist in Fig. 1 dargestellt (Abkürzungen: tT: Transkriptionsterminator; ori: Ursprung der DNA-Replikation; amp: Ampicillinresistenzgen).

6. Rekombinante Expression des sbsA-Gens in *E. coli*

E. coli pop2135/pBK4-Zellen wurden bei 28°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,3 kultiviert. Dann wurde die Expression von sbsA durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 28°C auf 42°C induziert. 1,5 ml Aliquots wurden vor bzw. 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Induktion der sbsA-Expression entnommen. Als Kontrollen wurden *E. coli* pop2135/pPLcAT10 (kultiviert unter den gleichen Bedingungen) und *B.stearothermophilus* PV72 verwendet.

Kulturüberstände und Zellextrakte aus allen Proben wurden auf die Expression des S-Layer-Proteins durch SDS-PAGE und Western-Immunoblotting untersucht.

In Extrakten aus mit pBK4 transformierten *E. coli*-Zellen wurde eine zusätzliche starke Proteinbande mit dem gleichen Molekulargewicht wie das Wildtyp-SbsA-Protein gefunden. Es wurden keine Abbauprodukte von SbsA selbst in einem Zeitraum bis zu 5 Stunden nach der Induktion der Expression gefunden. Dies läßt vermuten, daß das S-Layer-Protein sbsA in *E. coli* stabil ist und nicht durch Proteasen abgebaut wird.

Es wurde eine densitometrische Bestimmung der relativen Menge an SbsA-Protein durchgeführt. Zu einem Zeitpunkt von 4 Stunden nach der Induktion lag das sbsA-Protein in einem Anteil von ca. 16% bezüglich des gesamten zellulären Proteins vor.

Das in *E. coli* erzeugte SbsA-Protein wanderte im SDS-Gel etwas langsamer als das natürliche SbsA-Protein aus *B.stearothermophilus*. Versuche zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz des SbsA-Proteins durch Edman-Abbau schlugen aufgrund einer Blockierung des N-Terminus fehl. Dies läßt vermuten, daß die Signalsequenz in *E. coli* nicht abgespalten wurde.

Auch eine Western Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen von *E. coli*/pBK4 ergab nur eine einzige sbsA-spezifische Proteinbande mit einem etwas höheren Molekulargewicht als das Wildtyp-SbsA-Protein aus *stearothermophilus*.

Für den Western Blot wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen Antiserum gegen SbsA aus Kaninchen inkubiert. Die Herstellung dieses Antiserums ist bei Egel-seer et al. (J. Bacteriol. 177 (1995), 1444–1451) beschrieben. Zum Nachweis gebundener SbsA-spezifischer Antikörper wurde ein Konjugat aus Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG und alkalischer Phosphatase verwendet.

Aus Überständen von mit pBK4 transformierten *E. coli*-Zellen konnte auch nach Induktion der sbsA-Gen-Expression kein SbsA-Protein nachgewiesen werden. Daraus ist ersichtlich, daß SbsA nicht in das umgebende Medium exportiert wird.

7. Lokalisierung und Organisation des S-Layer-Proteins SbsA im Cytoplasma von *E. coli*

Zellen aus *E. coli* pop2135/pBK4, die aus Kulturen mit 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Induktion der S-Layer-Proteinexpression geerntet wurden, wurden auf die intrazelluläre Organisation von sbsA untersucht. Nichtinduzierte, bei 28°C kultivierte Zellen und Zellen von *B.stearothermophilus* PV72 wurden als Kontrollen untersucht.

Hierzu wurden gesamte Zellen beider Organismen fixiert und in Spurrharz nach der Methode von Messner et

al. (Int. J. Syst. Bacteriol. 34 (1984), 202–210) fixiert und eingebettet. Anschließend wurden ultradünne Schnitte der eingebetteten Präparate hergestellt und mit Uranylacetat angefärbt.

Das Cytoplasma von nichtinduzierten *E. coli*-Zellen zeigte die typische granuläre Struktur, die sich auch bei einer Zunahme der OD der Suspensionen nicht änderte. Längsschnitte von *E. coli*-Zellen, die 1 Stunde nach Induktion der S-Layer-Proteinexpression geerntet wurden, zeigten parallele, blattartige Strukturen im Cytoplasma. Aus Querschnitten wurde ersichtlich, daß diese Strukturen eine konzentrische Anordnung zeigten.

Der Anteil blattartiger Strukturen zeigte einen deutlichen Anstieg zwischen 1 und 2 Stunden nach Induktion der sbsA-Expression und blieb danach im wesentlichen konstant.

Das in *E. coli* rekombinant hergestellte sbsA-Protein konnte auch durch Immunogoldmarkierung mit SbsA-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Auch mit dieser Nachweismethode wurde eine geordnete Struktur des rekombinant hergestellten SbsA-Proteins gefunden.

Aus diesen morphologischen Daten war klar ersichtlich, daß das SbsA-Protein sich nicht zu unregelmäßigen Einschlußkörpern aggregierte, sondern monomolekulare S-Layer-Kristalle bildete. Eine bemerkenswerte Eigenschaft der in *E. coli* assemblierten SbsA-S-Layer-Schichten war die konzentrische Anordnung in definierten Abständen. Das Vorhandensein der Signalsequenz störte die korrekte Assemblierung nicht.

8. Herstellung von rekombinanten sbsA-S-Layer-Genen

Für die ortsspezifische Insertionsmutagenese des sbsA-Gens wurde eine modifizierte Kanamycinkassette (1,3 kb) verwendet, die durch Spaltung des Plasmids pwJC3 (erhalten von W.T. McAllister, New York) durch SmaI isoliert wurde. Die Kassette wurde in fünf verschiedene glattendige Restriktionsstellen des sbsA-Gens ligiert, nämlich in die NruI-Stelle an Position bp 582 (pSL582), in die SnaBI-Stelle an bp 917 (pSL917) und in jede der PvuII-Stellen an Position bp 878 (pSL878), bp 2504 (pSL2504) und bp 2649 (pSL2649). Nach Selektion von Kanamycinresistenten Klonen wurde die Kassette aus der Insertionsstelle durch Spaltung mit ApaI, gefolgt von einer Religation des S-Layer-Plasmids pBK4, entfernt. Durch die Herausschneide- und Religationsprozedur blieb eine Insertion von 6 bp CCCGGG zurück. Das System dieser Linkerinsertion ist schematisch in Fig. 2 dargestellt.

Die resultierenden rekombinanten S-Layer-Gene kodieren für modifizierte, um 2 Aminosäuren verlängerte sbsA-Proteine.

Die konkreten Änderungen in der Primärstruktur der sbsA-Proteine sind in Fig. 3 gezeigt. Im Klon pSL582 führte die Insertion zur Einfügung von Glycin und Prolin zwischen den Aminosäuren 194 und 195 am N-Terminus des SbsA-Proteins. Die Aminosäuren Alanin und Arginin wurden im Klon pSL917 zwischen die Aminosäuren 306 und 307 eingefügt. Im Klon pSL2649 wurde eine Insertion von Glycin und Prolin zwischen die Aminosäuren an den Positionen 883 und 884 eingefügt. Eine Insertion von Alanin und Prolin zwischen den Aminosäuren 293 und 294 wurde im Klon pSL878 erhalten. Weiterhin wurde das Alanin an Position 293 durch Glycin ausgetauscht. Im Klon pSL2504 wurden die Aminosäuren Alanin und Prolin zwischen die Aminosäuren 835 und 836 eingeführt und das Alanin an Position 835 durch Glycin ersetzt.

Alle durch Insertionsmutagenese erhaltenen Klone behielten ihre Fähigkeit zur Synthese des S-Layer-Proteins.

Um die Fähigkeit der modifizierten Proteine zur Assemblierung in S-Layer-Strukturen nachzuweisen, wurden gemäß der unter Punkt 7. beschriebenen Prozedur ultradünne Längsschnitte von gesamten Zellen, die 4h unter induktiven Bedingungen kultiviert worden waren, hergestellt. Es wurde gefunden, daß das Cytoplasma aller 5 Klone mit parallelen, blattartigen Strukturen gefüllt ist, welche der Krümmung der Zellpole folgen. Es gab keine morphologischen Unterschiede des Zytoplasma bei den 5 untersuchten verschiedenen Klonen. Es wurden genau die gleichen blattartigen Strukturen wie bei der Assemblierung des Wildtyp-SbsA-Protein in *E. coli* (Punkt 7.) festgestellt.

Auf analoge Weise wurde ein mit ApaI-Linkern versehenes DNA-Fragment (SEQ ID NO. 7) in die Schnittstelle an Position 581 integriert, das für ein Teilfragment von Streptavidin kodiert.

9. Isolierung und Charakterisierung des sbsB-Gens

Als Grundlage für die Isolierung des sbsB-Gens diente die Aminosäuresequenz des N-Terminus sowie die Sequenz von 3 internen Peptiden des SbsB-Proteins. Von diesen Peptidsequenzen ausgehend wurden degenierte Oligonukleotidprimer konstruiert und für die PCR eingesetzt. Auf diese Weise wurde ein 1076 bp langes PCR-Fragment aus der chromosomalen DNA von *B. stearothermophilus* amplifiziert, kloniert und sequenziert (entsprechend Position 100–1176 der in SEQ ID NO. 5 gezeigten Sequenz).

Für die Amplifikation der 5'- und 3'-seitigen Abschnitte des sbsB-Gens wurde die Methode der inversen PCR angewendet und mit Hilfe verschiedener Primerkombinationen schrittweise überlappende DNA-Fragmente erhalten und sequenziert.

Zur Amplifizierung des vollständigen sbsB-Gens wurden als Primer der im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO. 8 angegebene Primer NIS 2AG, der den 5'-Bereich von sbsB enthält, sowie der im Sequenzprotokoll in SEQ ID NO. 9 angegebene Primer LIS C3 verwendet, der den 3'-Bereich von sbsB enthält.

Das auf diese Weise erhaltene PCR-Fragment, welches die in SEQ ID NO. 5 gezeigte Nukleotidsequenz mit 5'- und 3'-BamHI-Restriktionsschnittstellen enthält, wurde wie im Beispiel 5 beschrieben in den Vektor pPLCAT10 kloniert, in dem die Expression unter Kontrolle des Lambda PL-Promotors erfolgte.

Weiterhin wurde das sbsB-PCR-Fragment mit 5'seitiger EcoRI- und 3'seitiger BamHI-Schnittstelle in den Vektor pUC18 kloniert, in dem die Expression unter Kontrolle des lac-Promotors erfolgte.

Der Nachweis der sbsB-Expression erfolgte wie in den Beispielen 6 und 7 beschrieben durch SDS-Gelelektro-

phorese und Elektronenmikroskopie.

SEQUENZPROTOKOLL

- (1) ALLGEMEINE ANGABEN: 5
- (i) ANMELDER:
- (A) NAME: Werner Lubitz
(B) STRASSE: Schoenborngasse 12/7 10
(C) ORT: Wien
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 1080
- (A) NAME: Uwe Sleytr
(B) STRASSE: Parhamerplatz 10 15
(C) ORT: Wien
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 1170
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante Expression von S-Layer-Proteinen 20
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9
- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG: 25
- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA) 30
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 3687 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid 35
(C) STRANGFORM: beides
(D) TOPOLOGIE: linear
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: 40
- (A) ORGANISMUS: Bacillus stearothermophilus
(B) STAMM: PV72
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT: 45
- (B) CLON(E): sbsA
- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:1..3684
- (ix) MERKMAL: 50
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
(B) LAGE:1..90
- (ix) MERKMAL: 55
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE:91..3684
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1: 60
- ATG GAT AGG AAA AAA GCT GTG AAA CTA GCA ACA GCA AGT GCT ATT GCA 48
Met Asp Arg Lys Lys Ala Val Lys Leu Ala Thr Ala Ser Ala Ile Ala
-30 -25 -20 -15

65

DE 196 03 649

	GCA AGT GCA TTT GTC GCT GCA AAT CCA AAC GCT TCT GAA GCG GCT ACA	96
	Ala Ser Ala Phe Val Ala Ala Asn Pro Asn Ala Ser Glu Ala Ala Thr	
	-10 -5 1	
5	GAT GTA GCA ACA GTA GTA AGC CAA GCA AAA GCA CAG TTC AAA AAA GCA	144
	Asp Val Ala Thr Val Val Ser Gln Ala Lys Ala Gln Phe Lys Lys Ala	
	5 10 15	
10	TAC TAT ACT TAC AGC CAT ACA GTA ACG GAA ACT GGT GAA TTC CCA AAC	192
	Tyr Tyr Thr Tyr Ser His Thr Val Thr Glu Thr Gly Glu Phe Pro Asn	
	20 25 30	
15	ATT AAC GAT GTA TAT GCT GAA TAC AAC AAA GCG AAA AAA CGA TAC CGT	240
	Ile Asn Asp Val Tyr Ala Glu Tyr Asn Lys Ala Lys Lys Arg Tyr Arg	
	35 40 45 50	
	GAT GCG GTA GCA TTA GTG AAT AAA GCA GGT GGC GCG AAA AAA GAC GCT	288
	Asp Ala Val Ala Leu Val Asn Lys Ala Gly Gly Ala Lys Lys Asp Ala	
	55 60 65	
20	TAC TTA GCT GAT TTA CAA AAA GAA TAT GAA ACT TAC GTT TTC AAA GCA	336
	Tyr Leu Ala Asp Leu Gln Lys Glu Tyr Glu Thr Tyr Val Phe Lys Ala	
	70 75 80	
25	AAC CCT AAA TCT GGC GAA GCT CGT GTA GCA ACT TAC ATC GAT GCT TAC	384
	Asn Pro Lys Ser Gly Glu Ala Arg Val Ala Thr Tyr Ile Asp Ala Tyr	
	85 90 95	
30	AAC TAT GCA ACA AAA TTA GAC GAA ATG CGC CAA GAG CTA GAG GCT GCT	432
	Asn Tyr Ala Thr Lys Leu Asp Glu Met Arg Gln Glu Leu Glu Ala Ala	
	100 105 110	
	GTT CAA GCA AAA GAT TTA GAA AAA GCA GAA CAA TAC TAT CAC AAA ATT	480
	Val Gln Ala Lys Asp Leu Glu Lys Ala Glu Gln Tyr Tyr His Lys Ile	
	115 120 125 130	
35	CCT TAT GAA ATT AAA ACT CGC ACA GTC ATT TTA GAT CGC GTA TAT GGT	528
	Pro Tyr Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ile Leu Asp Arg Val Tyr Gly	
	135 140 145	
40	AAA ACA ACT CGT GAT TTA CTT CGC TCT ACA TTT AAA GCA AAA GCA CAA	576
	Lys Thr Thr Arg Asp Leu Leu Arg Ser Thr Phe Lys Ala Lys Ala Gln	
	150 155 160	
45	GAA CTT CGC GAC AGC TTA ATT TAT GAT ATT ACC GTT GCA ATG AAA GCG	624
	Glu Leu Arg Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Ile Thr Val Ala Met Lys Ala	
	165 170 175	
	CGC GAA GTA CAA GAC GCT GTG AAA GCA GGC AAT TTA GAC AAA GCT AAA	672
	Arg Glu Val Gln Asp Ala Val Lys Ala Gly Asn Leu Asp Lys Ala Lys	
	180 185 190	
50	GCT GCT GTT GAT CAA ATC AAT CAA TAC TTA CCA AAA GTA ACA GAT GCT	720
	Ala Ala Val Asp Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Pro Lys Val Thr Asp Ala	
	195 200 205 210	
55	TTC AAA ACT GAA CTA ACA GAA GTA GCG AAA AAA GCA TTA GAT GCA GAT	768
	Phe Lys Thr Glu Leu Thr Glu Val Ala Lys Lys Ala Leu Asp Ala Asp	
	215 220 225	
60	GAA GCT GCG CTT ACT CCA AAA GTT GAA AGT GTA AGT GCG ATT AAC ACT	816
	Glu Ala Ala Leu Thr Pro Lys Val Glu Ser Val Ser Ala Ile Asn Thr	
	230 235 240	

65

DE 196 03 649 A1

CAA AAC AAA GCT GTT GAA TTA ACA GCA GTA CCA GTG AAC GGA ACA CTA Gln Asn Lys Ala Val Glu Leu Thr Ala Val Pro Val Asn Gly Thr Leu 245 250 255	864	
AAA TTA CAA CTT TCA GCT GCT GCA AAT GAA GAT ACA GTA AAC GTA AAT Lys Leu Gln Leu Ser Ala Ala Asn Glu Asp Thr Val Asn Val Asn 260 265 270	912	5
ACT GTA CGT ATC TAT AAA GTG GAC GGT AAC ATT CCA TTT GCC CTT AAT Thr Val Arg Ile Tyr Lys Val Asp Gly Asn Ile Pro Phe Ala Leu Asn 275 280 285 290	960	10
ACG GCA GAT GTT TCT TTA TCT ACA GAC GGA AAA ACT ATC ACT GTG GAT Thr Ala Asp Val Ser Leu Ser Thr Asp Gly Lys Thr Ile Thr Val Asp 295 300 305	1008	15
GCT TCA ACT CCA TTC GAA AAT AAT ACG GAG TAT AAA GTA GTA GTT AAA Ala Ser Thr Pro Phe Glu Asn Asn Thr Glu Tyr Lys Val Val Val Lys 310 315 320	1056	
GGT ATT AAA GAC AAA AAT GGC AAA GAA TTT AAA GAA GAT GCA TTC ACT Gly Ile Lys Asp Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Glu Asp Ala Phe Thr 325 330 335	1104	20
TTC AAG CTT CGA AAT GAT GCT GTA GTT ACT CAA GTG TTT GGA ACT AAT Phe Lys Leu Arg Asn Asp Ala Val Val Thr Gln Val Phe Gly Thr Asn 340 345 350	1152	25
GTA ACA AAC AAC ACT TCT GTA AAC TTA GCA GCA GGT ACT TTC GAC ACT Val Thr Asn Asn Thr Ser Val Asn Leu Ala Ala Gly Thr Phe Asp Thr 355 360 365 370	1200	30
GAC GAT ACT TTA ACA GTA GTA TTT GAT AAG TTG TTA GCA CCT GAA ACT Asp Asp Thr Leu Thr Val Val Phe Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr 375 380 385	1248	
GTA AAC AGC TCG AAC GTT ACT ATT ACA GAT GTT GAA ACT GGA AAA CGC Val Asn Ser Ser Asn Val Thr Ile Thr Asp Val Glu Thr Gly Lys Arg 390 395 400	1296	35
ATT CCA GTA ATT GCA TCT ACT TCT GGT TCT ACA ATT ACT ATT ACG TTA Ile Pro Val Ile Ala Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Thr Ile Thr Leu 405 410 415	1344	40
AAA GAA GCG TTA GTA ACT GGT AAA CAA TAT AAA CTT GCT ATC AAT AAT Lys Glu Ala Leu Val Thr Gly Lys Gln Tyr Lys Leu Ala Ile Asn Asn 420 425 430	1392	45
GTT AAA ACA TTA ACT GGT TAC AAT GCA GAA GCT TAC GAG TTA GTG TTC Val Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Asn Ala Glu Ala Tyr Glu Leu Val Phe 435 440 445 450	1440	
ACT GCA AAC GCA TCA GCA CCA ACT GTT GCT ACC GCT CCT ACT ACT TTA Thr Ala Asn Ala Ser Ala Pro Thr Val Ala Thr Ala Pro Thr Thr Leu 455 460 465	1488	50
GGT GGT ACA ACT TTA TCT ACT GGT TCT CTT ACA ACA AAT GTT TGG GGT Gly Gly Thr Thr Leu Ser Thr Gly Ser Leu Thr Thr Asn Val Trp Gly 470 475 480	1536	55
AAA TTG GCT GGT GGT GTG AAT GAA GCT GGA ACT TAT TAT CCT GGT CTT Lys Leu Ala Gly Gly Val Asn Glu Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Gly Leu 485 490 495	1584	60

65

DE 196 03 649

	CAA	TTC	ACA	ACA	ACG	TTT	GCT	ACT	AAG	TTA	GAC	GAA	TCT	ACT	TTA	GCT	1632
	Gln	Phe	Thr	Thr	Thr	Phe	Ala	Thr	Lys	Leu	Asp	Glu	Ser	Thr	Leu	Ala	
	500					505					510						
5	GAT	AAC	TTT	GTA	TTA	GTT	GAA	AAA	GAA	TCT	GGT	ACA	GTT	GTT	GCT	TCT	1680
	Asp	Asn	Phe	Val	Leu	Val	Glu	Lys	Glu	Ser	Gly	Thr	Val	Val	Ala	Ser	
	515				520					525					530		
10	GAA	CTA	AAA	TAT	AAT	GCA	GAC	GCT	AAA	ATG	GTA	ACT	TTA	GTG	CCA	AAA	1728
	Glu	Leu	Lys	Tyr	Asn	Ala	Asp	Ala	Lys	Met	Val	Thr	Leu	Val	Pro	Lys	
					535					540					545		
15	GCG	GAC	CTT	AAA	GAA	AAT	ACA	ATC	TAT	CAA	ATC	AAA	ATT	AAA	AAA	GGC	1776
	Ala	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Thr	Ile	Tyr	Gln	Ile	Lys	Ile	Lys	Lys	Gly	
				550					555					560			
	TTG	AAG	TCC	GAT	AAA	GGT	ATT	GAA	TTA	GGC	ACT	GTT	AAC	GAG	AAA	ACA	1824
	Leu	Lys	Ser	Asp	Lys	Gly	Ile	Glu	Leu	Gly	Thr	Val	Asn	Glu	Lys	Thr	
			565					570					575				
20	TAT	GAG	TTC	AAA	ACT	CAA	GAC	TTA	ACT	GCT	CCT	ACA	GTT	ATT	AGC	GTA	1872
	Tyr	Glu	Phe	Lys	Thr	Gln	Asp	Leu	Thr	Ala	Pro	Thr	Val	Ile	Ser	Val	
		580					585					590					
25	ACG	TCT	AAA	AAT	GGC	GAC	GCT	GGA	TTA	AAA	GTA	ACT	GAA	GCT	CAA	GAA	1920
	Thr	Ser	Lys	Asn	Gly	Asp	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Thr	Glu	Ala	Gln		
	595					600					605				610		
30	TTT	ACT	GTG	AAG	TTC	TCA	GAG	AAT	TTA	AAT	ACA	TTT	AAT	GCT	ACA	ACC	1968
	Phe	Thr	Val	Lys	Phe	Ser	Glu	Asn	Leu	Asn	Thr	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	
					615					620					625		
	GTT	TCG	GGT	AGC	ACA	ATC	ACA	TAC	GGT	CAA	GTT	GCT	GTA	GTA	AAA	GCG	2016
	Val	Ser	Gly	Ser	Thr	Ile	Thr	Tyr	Gly	Gln	Val	Ala	Val	Val	Lys	Ala	
				630					635					640			
35	GGT	GCA	AAC	TTA	TCT	GCT	CTT	ACA	GCA	AGT	GAC	ATC	ATT	CCA	GCT	AGT	2064
	Gly	Ala	Asn	Leu	Ser	Ala	Leu	Thr	Ala	Ser	Asp	Ile	Ile	Pro	Ala	Ser	
			645					650					655				
40	GTT	GAA	GCG	GTT	ACT	GGT	CAA	GAT	GGA	ACA	TAC	AAA	GTG	AAA	GTT	GCT	2112
	Val	Glu	Ala	Val	Thr	Gly	Gln	Asp	Gly	Thr	Tyr	Lys	Val	Lys	Val	Ala	
		660					665					670					
45	GCT	AAC	CAA	TTA	GAA	CGT	AAC	CAA	GGG	TAC	AAA	TTA	GTA	GTG	TTC	GGT	2160
	Ala	Asn	Gln	Leu	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Phe	Gly	
	675					680					685					690	
	AAA	GGT	GCA	ACA	GCT	CCT	GTT	AAA	GAT	GCT	GCA	AAT	GCA	AAT	ACT	TTA	2208
	Lys	Gly	Ala	Thr	Ala	Pro	Val	Lys	Asp	Ala	Ala	Asn	Ala	Asn	Thr	Leu	
					695					700					705		
50	GCA	ACT	AAC	TAT	ATC	TAT	ACA	TTT	ACA	ACT	GAA	GGT	CAA	GAC	GTA	ACA	2256
	Ala	Thr	Asn	Tyr	Ile	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Glu	Gly	Gln	Asp	Val	Thr	
				710					715					720			
55	GCA	CCA	ACG	GTT	ACA	AAA	GTA	TTC	AAA	GGT	GAT	TCT	TTA	AAA	GAC	GCT	2304
	Ala	Pro	Thr	Val	Thr	Lys	Val	Phe	Lys	Gly	Asp	Ser	Leu	Lys	Asp	Ala	
			725					730					735				
60	GAT	GCA	GTT	ACT	ACA	CTT	ACG	AAC	GTT	GAT	GCA	GGT	CAA	AAA	TTC	ACT	2352
	Asp	Ala	Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Asn	Val	Asp	Ala	Gly	Gln	Lys	Phe	Thr	
		740					745					750					

65

ATC CAA TTT AGC GAA GAA TTA AAA ACT TCT AGT GGT TCT TTA GTG GGT Ile Gln Phe Ser Glu Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gly 755 760 765 770	2400	
GGC AAA GTA ACT GTC GAG AAA TTA ACA AAC AAC GGA TGG GTA GAT GCT Gly Lys Val Thr Val Glu Lys Leu Thr Asn Asn Gly Trp Val Asp Ala 775 780 785	2448	5
GGT ACT GGA ACA ACT GTA TCA GTT GCT CCT AAG ACA GAT GCA AAT GGT Gly Thr Gly Thr Thr Val Ser Val Ala Pro Lys Thr Asp Ala Asn Gly 790 795 800	2496	10
AAA GTA ACA GCT GCT GTG GTT ACA TTA ACT GGT CTT GAC AAT AAC GAC Lys Val Thr Ala Ala Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Asp Asn Asn Asp 805 810 815	2544	15
AAA GAT GCG AAA TTG CGT CTG GTA GTA GAT AAG TCT TCT ACT GAT GGA Lys Asp Ala Lys Leu Arg Leu Val Val Asp Lys Ser Ser Thr Asp Gly 820 825 830	2592	
ATT GCT GAT GTA GCT GGT AAT GTA ATT AAG GAA AAA GAT ATT TTA ATT Ile Ala Asp Val Ala Gly Asn Val Ile Lys Glu Lys Asp Ile Leu Ile 835 840 845 850	2640	20
CGT TAC AAC AGC TGG AGA CAC ACT GTA GCT TCT GTG AAA GCT GCT GCT Arg Tyr Asn Ser Trp Arg His Thr Val Ala Ser Val Lys Ala Ala Ala 855 860 865	2688	25
GAC AAA GAT GGT CAA AAC GCT TCT GCT GCA TTC CCA ACA AGC ACT GCA Asp Lys Asp Gly Gln Asn Ala Ser Ala Ala Phe Pro Thr Ser Thr Ala 870 875 880	2736	30
ATT GAT ACA ACT AAG AGC TTA TTA GTT GAA TTC AAT GAA ACT GAT TTA Ile Asp Thr Thr Lys Ser Leu Leu Val Glu Phe Asn Glu Thr Asp Leu 885 890 895	2784	
GCG GAA GTT AAA CCT GAG AAC ATC GTT GTT AAA GAT GCA GCA GGT AAT Ala Glu Val Lys Pro Glu Asn Ile Val Val Lys Asp Ala Ala Gly Asn 900 905 910	2832	35
GCG GTA GCT GGT ACT GTA ACA GCA TTA GAC GGT TCT ACA AAT AAA TTT Ala Val Ala Gly Thr Val Thr Ala Leu Asp Gly Ser Thr Asn Lys Phe 915 920 925 930	2880	40
GTA TTC ACT CCA TCT CAA GAA TTA AAA GCT GGT ACA GTT TAC TCT GTA Val Phe Thr Pro Ser Gln Glu Leu Lys Ala Gly Thr Val Tyr Ser Val 935 940 945	2928	45
ACA ATT GAC GGT GTG AGA GAT AAA GTA GGT AAC ACA ATC TCT AAA TAC Thr Ile Asp Gly Val Arg Asp Lys Val Gly Asn Thr Ile Ser Lys Tyr 950 955 960	2976	
ATT ACT TCG TTC AAG ACT GTA TCT GCG AAT CCA ACG TTA TCT TCA ATC Ile Thr Ser Phe Lys Thr Val Ser Ala Asn Pro Thr Leu Ser Ser Ile 965 970 975	3024	50
AGC ATT GCT GAC GGT GCA GTT AAC GTT GAC CGT TCT AAA ACA ATT ACA Ser Ile Ala Asp Gly Ala Val Asn Val Asp Arg Ser Lys Thr Ile Thr 980 985 990	3072	55
ATT GAA TTC AGC GAT TCA GTT CCA AAC CCA ACA ATC ACT CTT AAG AAG Ile Glu Phe Ser Asp Ser Val Pro Asn Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys 995 1000 1005 1010	3120	60

	GCT	GAC	GGA	ACT	TCA	TTT	ACT	AAT	TAC	ACT	TTA	GTA	AAT	GTA	AAT	AAT	3158
	Ala	Asp	Gly	Thr	Ser	Phe	Thr	Asn	Tyr	Thr	Leu	Val	Asn	Val	Asn	Asn	
				1015						1020					1025		
5	GAA	AAT	AAA	ACA	TAC	AAA	ATT	GTA	TTC	CAC	AAA	GGT	GTA	ACA	CTT	GAC	3216
	Glu	Asn	Lys	Thr	Tyr	Lys	Ile	Val	Phe	His	Lys	Gly	Val	Thr	Leu	Asp	
				1030					1035					1040			
	GAG	TTT	ACT	CAA	TAT	GAG	TTA	GCA	GTT	TCA	AAA	GAT	TTT	CAA	ACT	GGT	3264
10	Glu	Phe	Thr	Gln	Tyr	Glu	Leu	Ala	Val	Ser	Lys	Asp	Phe	Gln	Thr	Gly	
			1045					1050					1055				
	ACT	GAT	ATT	GAT	AGC	AAA	GTT	ACA	TTC	ATC	ACA	GGT	TCT	GTT	GCT	ACT	3312
	Thr	Asp	Ile	Asp	Ser	Lys	Val	Thr	Phe	Ile	Thr	Gly	Ser	Val	Ala	Thr	
		1060					1065					1070					
15	GAC	GAA	GTA	AAA	CCT	GCT	CTA	GTA	GGC	GTT	GGT	TCA	TGG	AAT	GGA	ACA	3360
	Asp	Glu	Val	Lys	Pro	Ala	Leu	Val	Gly	Val	Gly	Ser	Trp	Asn	Gly	Thr	
	1075					1080					1085					1090	
20	AGC	TAT	ACT	CAG	GAT	GCT	GCA	GCA	ACA	CGA	CTT	CGG	TCT	GTA	GCT	GAC	3408
	Ser	Tyr	Thr	Gln	Asp	Ala	Ala	Ala	Thr	Arg	Leu	Arg	Ser	Val	Ala	Asp	
				1095						1100					1105		
	TTC	GTT	GCG	GAG	CCA	GTT	GCC	CTT	CAA	TTC	TCA	GAA	GGT	ATC	GAT	TTA	3456
25	Phe	Val	Ala	Glu	Pro	Val	Ala	Leu	Gln	Phe	Ser	Glu	Gly	Ile	Asp	Leu	
				1110					1115					1120			
	ACG	AAT	GCA	ACT	GTG	ACA	GTA	ACA	AAT	ATT	ACT	GAT	GAT	AAA	ACT	GTT	3504
	Thr	Asn	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Thr	Asn	Ile	Thr	Asp	Asp	Lys	Thr	Val	
30				1125				1130				1135					
	GAA	GTT	ATT	TCA	AAA	GAG	AGT	GTA	GAC	GCA	GAC	CAT	GAT	GCA	GGT	GCT	3552
	Glu	Val	Ile	Ser	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	Ala	Asp	His	Asp	Ala	Gly	Ala	
		1140					1145				1150						
35	ACT	AAG	GAG	ACA	TTA	GTA	ATT	AAC	ACA	GTT	ACT	CCT	TTA	GTA	CTT	GAT	3600
	Thr	Lys	Glu	Thr	Leu	Val	Ile	Asn	Thr	Val	Thr	Pro	Leu	Val	Leu	Asp	
	1155					1160					1165					1170	
	AAC	AGC	AAG	ACT	TAT	AAG	ATT	GTT	GTA	AGT	GGA	GTT	AAA	GAT	GCA	GCA	3648
40	Asn	Ser	Lys	Thr	Tyr	Lys	Ile	Val	Val	Ser	Gly	Val	Lys	Asp	Ala	Ala	
				1175						1180					1185		
	GGT	AAT	GTT	GCA	GAT	ACT	ATT	ACA	TTC	TAT	ATT	AAG	TAA				3687
45	Gly	Asn	Val	Ala	Asp	Thr	Ile	Thr	Phe	Tyr	Ile	Lys					
				1190					1195								

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- 50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 1228 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

- 55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Asp Arg Lys Lys Ala Val Lys Leu Ala Thr Ala Ser Ala Ile Ala
 -30 -25 -20 -15
 60 Ala Ser Ala Phe Val Ala Ala Asn Pro Asn Ala Ser Glu Ala Ala Thr
 -10 -5 1

65

Asp	Val	Ala	Thr	Val	Val	Ser	Gln	Ala	Lys	Ala	Gln	Phe	Lys	Lys	Ala		
	5						10					15					
Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Ser	His	Thr	Val	Thr	Glu	Thr	Gly	Glu	Phe	Pro	Asn		5
	20					25					30						
Ile	Asn	Asp	Val	Tyr	Ala	Glu	Tyr	Asn	Lys	Ala	Lys	Lys	Arg	Tyr	Arg		
	35				40					45					50		
Asp	Ala	Val	Ala	Leu	Val	Asn	Lys	Ala	Gly	Gly	Ala	Lys	Lys	Asp	Ala		10
				55					60					65			
Tyr	Leu	Ala	Asp	Leu	Gln	Lys	Glu	Tyr	Glu	Thr	Tyr	Val	Phe	Lys	Ala		
			70					75					80				
Asn	Pro	Lys	Ser	Gly	Glu	Ala	Arg	Val	Ala	Thr	Tyr	Ile	Asp	Ala	Tyr		15
		85					90					95					
Asn	Tyr	Ala	Thr	Lys	Leu	Asp	Glu	Met	Arg	Gln	Glu	Leu	Glu	Ala	Ala		20
	100					105					110						
Val	Gln	Ala	Lys	Asp	Leu	Glu	Lys	Ala	Glu	Gln	Tyr	Tyr	His	Lys	Ile		
	115				120					125					130		
Pro	Tyr	Glu	Ile	Lys	Thr	Arg	Thr	Val	Ile	Leu	Asp	Arg	Val	Tyr	Gly		25
				135					140					145			
Lys	Thr	Thr	Arg	Asp	Leu	Leu	Arg	Ser	Thr	Phe	Lys	Ala	Lys	Ala	Gln		
			150					155					160				
Glu	Leu	Arg	Asp	Ser	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ile	Thr	Val	Ala	Met	Lys	Ala		30
		165					170					175					
Arg	Glu	Val	Gln	Asp	Ala	Val	Lys	Ala	Gly	Asn	Leu	Asp	Lys	Ala	Lys		
	180					185					190						
Ala	Ala	Val	Asp	Gln	Ile	Asn	Gln	Tyr	Leu	Pro	Lys	Val	Thr	Asp	Ala		35
	195				200					205					210		
Phe	Lys	Thr	Glu	Leu	Thr	Glu	Val	Ala	Lys	Lys	Ala	Leu	Asp	Ala	Asp		40
				215					220					225			
Glu	Ala	Ala	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Glu	Ser	Val	Ser	Ala	Ile	Asn	Thr		
			230					235					240				
Gln	Asn	Lys	Ala	Val	Glu	Leu	Thr	Ala	Val	Pro	Val	Asn	Gly	Thr	Leu		45
		245				250						255					
Lys	Leu	Gln	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Asn	Glu	Asp	Thr	Val	Asn	Val	Asn		
	260					265					270						
Thr	Val	Arg	Ile	Tyr	Lys	Val	Asp	Gly	Asn	Ile	Pro	Phe	Ala	Leu	Asn		50
	275				280					285					290		
Thr	Ala	Asp	Val	Ser	Leu	Ser	Thr	Asp	Gly	Lys	Thr	Ile	Thr	Val	Asp		
				295					300					305			
Ala	Ser	Thr	Pro	Phe	Glu	Asn	Asn	Thr	Glu	Tyr	Lys	Val	Val	Val	Lys		55
			310					315					320				
Gly	Ile	Lys	Asp	Lys	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Glu	Asp	Ala	Phe	Thr		60
		325				330						335					

Phe Lys Leu Arg Asn Asp Ala Val Val Thr Gln Val Phe Gly Thr Asn
 340 345 350
 Val Thr Asn Asn Thr Ser Val Asn Leu Ala Ala Gly Thr Phe Asp Thr
 5 355 360 365 370
 Asp Asp Thr Leu Thr Val Val Phe Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr
 375 380 385
 Val Asn Ser Ser Asn Val Thr Ile Thr Asp Val Glu Thr Gly Lys Arg
 10 390 395 400
 Ile Pro Val Ile Ala Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Thr Ile Thr Leu
 405 410 415
 Lys Glu Ala Leu Val Thr Gly Lys Gln Tyr Lys Leu Ala Ile Asn Asn
 15 420 425 430
 Val Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Asn Ala Glu Ala Tyr Glu Leu Val Phe
 20 435 440 445 450
 Thr Ala Asn Ala Ser Ala Pro Thr Val Ala Thr Ala Pro Thr Thr Leu
 455 460 465
 Gly Gly Thr Thr Leu Ser Thr Gly Ser Leu Thr Thr Asn Val Trp Gly
 25 470 475 480
 Lys Leu Ala Gly Gly Val Asn Glu Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Gly Leu
 485 490 495
 Gln Phe Thr Thr Thr Phe Ala Thr Lys Leu Asp Glu Ser Thr Leu Ala
 30 500 505 510
 Asp Asn Phe Val Leu Val Glu Lys Glu Ser Gly Thr Val Val Ala Ser
 515 520 525 530
 Glu Leu Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Lys Met Val Thr Leu Val Pro Lys
 35 535 540 545
 Ala Asp Leu Lys Glu Asn Thr Ile Tyr Gln Ile Lys Ile Lys Lys Gly
 40 550 555 560
 Leu Lys Ser Asp Lys Gly Ile Glu Leu Gly Thr Val Asn Glu Lys Thr
 565 570 575
 Tyr Glu Phe Lys Thr Gln Asp Leu Thr Ala Pro Thr Val Ile Ser Val
 45 580 585 590
 Thr Ser Lys Asn Gly Asp Ala Gly Leu Lys Val Thr Glu Ala Gln Glu
 595 600 605 610
 Phe Thr Val Lys Phe Ser Glu Asn Leu Asn Thr Phe Asn Ala Thr Thr
 50 615 620 625
 Val Ser Gly Ser Thr Ile Thr Tyr Gly Gln Val Ala Val Val Lys Ala
 630 635 640
 Gly Ala Asn Leu Ser Ala Leu Thr Ala Ser Asp Ile Ile Pro Ala Ser
 55 645 650 655
 Val Glu Ala Val Thr Gly Gln Asp Gly Thr Tyr Lys Val Lys Val Ala
 60 660 665 670

65

Ala Asn Gln Leu Glu Arg Asn Gln Gly Tyr Lys Leu Val Val Phe Gly 675 680 685 690	
Lys Gly Ala Thr Ala Pro Val Lys Asp Ala Ala Asn Ala Asn Thr Leu 695 700 705	5
Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Thr Phe Thr Thr Glu Gly Gln Asp Val Thr 710 715 720	
Ala Pro Thr Val Thr Lys Val Phe Lys Gly Asp Ser Leu Lys Asp Ala 725 730 735	10
Asp Ala Val Thr Thr Leu Thr Asn Val Asp Ala Gly Gln Lys Phe Thr 740 745 750	
Ile Gln Phe Ser Glu Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gly 755 760 765 770	15
Gly Lys Val Thr Val Glu Lys Leu Thr Asn Asn Gly Trp Val Asp Ala 775 780 785	20
Gly Thr Gly Thr Thr Val Ser Val Ala Pro Lys Thr Asp Ala Asn Gly 790 795 800	
Lys Val Thr Ala Ala Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Asp Asn Asn Asp 805 810 815	25
Lys Asp Ala Lys Leu Arg Leu Val Val Asp Lys Ser Ser Thr Asp Gly 820 825 830	
Ile Ala Asp Val Ala Gly Asn Val Ile Lys Glu Lys Asp Ile Leu Ile 835 840 845 850	30
Arg Tyr Asn Ser Trp Arg His Thr Val Ala Ser Val Lys Ala Ala Ala 855 860 865	
Asp Lys Asp Gly Gln Asn Ala Ser Ala Ala Phe Pro Thr Ser Thr Ala 870 875 880	35
Ile Asp Thr Thr Lys Ser Leu Leu Val Glu Phe Asn Glu Thr Asp Leu 885 890 895	40
Ala Glu Val Lys Pro Glu Asn Ile Val Val Lys Asp Ala Ala Gly Asn 900 905 910	
Ala Val Ala Gly Thr Val Thr Ala Leu Asp Gly Ser Thr Asn Lys Phe 915 920 925 930	45
Val Phe Thr Pro Ser Gln Glu Leu Lys Ala Gly Thr Val Tyr Ser Val 935 940 945	
Thr Ile Asp Gly Val Arg Asp Lys Val Gly Asn Thr Ile Ser Lys Tyr 950 955 960	50
Ile Thr Ser Phe Lys Thr Val Ser Ala Asn Pro Thr Leu Ser Ser Ile 965 970 975	
Ser Ile Ala Asp Gly Ala Val Asn Val Asp Arg Ser Lys Thr Ile Thr 980 985 990	55
Ile Glu Phe Ser Asp Ser Val Pro Asn Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys 995 1000 1005 1010	60
Ala Asp Gly Thr Ser Phe Thr Asn Tyr Thr Leu Val Asn Val Asn Asn 1015 1020 1025	

65

Glu Asn Lys Thr Tyr Lys Ile Val Phe His Lys Gly Val Thr Leu Asp
 1030 1035 1040
 Glu Phe Thr Gln Tyr Glu Leu Ala Val Ser Lys Asp Phe Gln Thr Gly
 1045 1050 1055
 Thr Asp Ile Asp Ser Lys Val Thr Phe Ile Thr Gly Ser Val Ala Thr
 1060 1065 1070
 Asp Glu Val Lys Pro Ala Leu Val Gly Val Gly Ser Trp Asn Gly Thr
 1075 1080 1085 1090
 Ser Tyr Thr Gln Asp Ala Ala Ala Thr Arg Leu Arg Ser Val Ala Asp
 1095 1100 1105
 Phe Val Ala Glu Pro Val Ala Leu Gln Phe Ser Glu Gly Ile Asp Leu
 1110 1115 1120
 Thr Asn Ala Thr Val Thr Val Thr Asn Ile Thr Asp Asp Lys Thr Val
 1125 1130 1135
 Glu Val Ile Ser Lys Glu Ser Val Asp Ala Asp His Asp Ala Gly Ala
 1140 1145 1150
 Thr Lys Glu Thr Leu Val Ile Asn Thr Val Thr Pro Leu Val Leu Asp
 1155 1160 1165 1170
 Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Ile Val Val Ser Gly Val Lys Asp Ala Ala
 1175 1180 1185
 Gly Asn Val Ala Asp Thr Ile Thr Phe Tyr Ile Lys
 1190 1195

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TTAATCGATT CTAGATGGAT AGGAAAAAAG CTG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATACCCGGGG GTACGGATCC GATACAGATT TGAGCAA

37

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2766 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

5

10

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Bacillus stearothermophilus
 (B) STAMM: PV72

15

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON(E): sbsB

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:1..2763

20

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
 (B) LAGE:1..93

25

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE:94..2763

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

ATG GCT TAT CAA CCT AAG TCT TTT CGC AAG TTT GTT GCG ACA ACT GCA 48
 Met Ala Tyr Gln Pro Lys Ser Phe Arg Lys Phe Val Ala Thr Thr Ala
 -31 -30 -25 -20 35

ACA GCT GCC ATT GTA GCA TCT GCG GTA GCT CCT GTA GTA TCT GCA GCA 96
 Thr Ala Ala Ile Val Ala Ser Ala Val Ala Pro Val Val Ser Ala Ala
 -15 -10 -5 1

AGC TTC ACA GAT GTT GCG CCG CAA TAT AAA GAT GCG ATC GAT TTC TTA 144 40
 Ser Phe Thr Asp Val Ala Pro Gln Tyr Lys Asp Ala Ile Asp Phe Leu
 5 10 15

GTA TCA ACT GGT GCA ACA AAA GGT AAA ACA GAA ACA AAA TTC GGC GTT 192 45
 Val Ser Thr Gly Ala Thr Lys Gly Lys Thr Glu Thr Lys Phe Gly Val
 20 25 30

TAC GAT GAA ATC ACT CGT CTA GAT GCG GCA GTT ATT CTT GCA AGA GTA 240
 Tyr Asp Glu Ile Thr Arg Leu Asp Ala Ala Val Ile Leu Ala Arg Val
 35 40 45 50

TTA AAA CTA GAC GTT GAC AAC GCA AAA GAC GCA GGC TTC ACA GAT GTG 288
 Leu Lys Leu Asp Val Asp Asn Ala Lys Asp Ala Gly Phe Thr Asp Val
 50 55 60 65

55

CCA AAA GAC CGT GCA AAA TAC GTC AAC GCG CTT GTA GAA GCT GGC GTA 336
 Pro Lys Asp Arg Ala Lys Tyr Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Gly Val
 70 75 80

TTA AAC GGT AAA GCA CCT GGC AAA TTT GGT GCA TAC GAC CCA TTA ACT 384 60
 Leu Asn Gly Lys Ala Pro Gly Lys Phe Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Thr
 85 90 95

65

	CGC	GTT	GAA	ATG	GCA	AAA	ATC	ATC	GCG	AAC	CGT	TAC	AAA	TTA	AAA	GCT	432
	Arg	Val	Glu	Met	Ala	Lys	Ile	Ile	Ala	Asn	Arg	Tyr	Lys	Leu	Lys	Ala	
			100					105					110				
5	GAC	GAT	GTA	AAA	CTT	CCA	TTC	ACT	GAT	GTA	AAC	GAT	ACA	TGG	GCA	CCA	480
	Asp	Asp	Val	Lys	Leu	Pro	Phe	Thr	Asp	Val	Asn	Asp	Thr	Trp	Ala	Pro	
		115					120					125					
10	TAC	GTA	AAA	GCG	CTT	TAT	AAA	TAC	GAA	GTA	ACC	AAA	AGG	TTA	AAA	CAC	528
	Tyr	Val	Lys	Ala	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Glu	Val	Thr	Lys	Arg	Leu	Lys	His	
	130					135					140					145	
15	CAA	CAA	GCT	TCG	GTG	CAT	ACC	AAA	AAC	ATC	ACT	CTG	CGT	GAC	TTT	GCG	576
	Gln	Gln	Ala	Ser	Val	His	Thr	Lys	Asn	Ile	Thr	Leu	Arg	Asp	Phe	Ala	
					150					155					160		
20	CAA	TTT	GTA	TAT	AGA	GCG	GTG	AAT	ATT	AAT	GCA	GTG	CCA	GAA	ATA	GTT	624
	Gln	Phe	Val	Tyr	Arg	Ala	Val	Asn	Ile	Asn	Ala	Val	Pro	Glu	Ile	Val	
				165					170					175			
25	GAA	GTA	ACT	GCG	GTT	AAT	TCG	ACT	ACA	GTG	AAA	GTA	ACA	TTC	AAT	ACG	672
	Glu	Val	Thr	Ala	Val	Asn	Ser	Thr	Thr	Val	Lys	Val	Thr	Phe	Asn	Thr	
			180					185					190				
30	CAA	ATT	GCT	GAT	GTT	GAT	TTC	ACA	AAT	TTT	GCT	ATC	GAT	AAC	GGT	TTA	720
	Gln	Ile	Ala	Asp	Val	Asp	Phe	Thr	Asn	Phe	Ala	Ile	Asp	Asn	Gly	Leu	
		195					200					205					
35	ACT	GTT	ACT	AAA	GCA	ACT	CTT	TCT	CGT	GAT	AAA	AAA	TCC	GTA	GAG	GTT	768
	Thr	Val	Thr	Lys	Ala	Thr	Leu	Ser	Arg	Asp	Lys	Lys	Ser	Val	Glu	Val	
	210					215					220					225	
40	GTG	GTA	AAT	AAA	CCG	TTT	ACT	CGT	AAT	CAG	GAA	TAT	ACA	ATT	ACA	GCG	816
	Val	Val	Asn	Lys	Pro	Phe	Thr	Arg	Asn	Gln	Glu	Tyr	Thr	Ile	Thr	Ala	
				230					235						240		
45	ACA	GGC	ATT	AAA	AAT	TTA	AAA	GGC	GAG	ACC	GCT	AAG	GAA	TTA	ACT	GGT	864
	Thr	Gly	Ile	Lys	Asn	Leu	Lys	Gly	Glu	Thr	Ala	Lys	Glu	Leu	Thr	Gly	
				245				250						255			
50	AAG	TTT	GTT	TGG	TCT	GTT	CAA	GAT	GCG	GTA	ACT	GTT	GCA	CTA	AAT	AAT	912
	Lys	Phe	Val	Trp	Ser	Val	Gln	Asp	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Leu	Asn	Asn	
			260					265					270				
55	AGT	TCG	CTT	AAA	GTT	GGA	GAG	GAA	TCT	GGT	TTA	ACT	GTA	AAA	GAT	CAG	960
	Ser	Ser	Leu	Lys	Val	Gly	Glu	Glu	Ser	Gly	Leu	Thr	Val	Lys	Asp	Gln	
		275				280						285					
60	GAT	GGC	AAA	GAT	GTT	GTA	GGT	GCT	AAA	GTA	GAA	CTT	ACT	TCT	TCT	AAT	1008
	Asp	Gly	Lys	Asp	Val	Val	Gly	Ala	Lys	Val	Glu	Leu	Thr	Ser	Ser	Asn	
		290				295					300					305	
65	ACT	AAT	ATT	GTT	GTA	GTT	TCA	AGT	GGC	GAA	GTA	TCA	GTA	TCT	GCT	GCT	1056
	Thr	Asn	Ile	Val	Val	Val	Ser	Ser	Gly	Glu	Val	Ser	Val	Ser	Ala	Ala	
				310						315					320		
70	AAA	GTT	ACA	GCT	GTA	AAA	CCG	GGA	ACA	GCT	GAT	GTT	ACT	GCA	AAA	GTT	1104
	Lys	Val	Thr	Ala	Val	Lys	Pro	Gly	Thr	Ala	Asp	Val	Thr	Ala	Lys	Val	
				325					330					335			
75	ACA	TTA	CCA	GAT	GGT	GTT	GTA	CTA	ACA	AAT	ACA	TTT	AAA	GTG	ACA	GTT	1152
	Thr	Leu	Pro	Asp	Gly	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Thr	Phe	Lys	Val	Thr	Val	
			340					345						350			

ACA GAA GTG CCT GTT CAA GTC CAA AAT CAA GGA TTT ACT TTA GTT GAT Thr Glu Val Pro Val Gln Val Gln Asn Gln Gly Phe Thr Leu Val Asp 355 360 365	1200	
AAT CTT TCT AAT GCT CCA CAG AAT ACA GTT GCA TTT AAC AAA GCT GAG Asn Leu Ser Asn Ala Pro Gln Asn Thr Val Ala Phe Asn Lys Ala Glu 370 375 380 385	1248	5
AAA GTA ACT TCA ATG TTT GCT GGA GAA ACT AAA ACA GTT GCA ATG TAT Lys Val Thr Ser Met Phe Ala Gly Glu Thr Lys Thr Val Ala Met Tyr 390 395 400	1296	10
GAT ACT AAA AAC GGT GAT CCT GAA ACT AAA CCT GTT GAT TTC AAA GAT Asp Thr Lys Asn Gly Asp Pro Glu Thr Lys Pro Val Asp Phe Lys Asp 405 410 415	1344	15
GCA ACT GTA CGT TCA TTA AAT CCA ATT ATT GCA ACA GCT GCT ATT AAT Ala Thr Val Arg Ser Leu Asn Pro Ile Ile Ala Thr Ala Ala Ile Asn 420 425 430	1392	
GGT AGT GAG CTC CTT GTC ACA GCT AAT GCT GGC CAA TCT GGA AAA GCT Gly Ser Glu Leu Leu Val Thr Ala Asn Ala Gly Gln Ser Gly Lys Ala 435 440 445	1440	20
TCA TTT GAA GTA ACA TTA AAA GAT AAT ACA AAA AGA ACA TTT ACA GTT Ser Phe Glu Val Thr Leu Lys Asp Asn Thr Lys Arg Thr Phe Thr Val 450 455 460 465	1488	25
GAT GTA AAA AAA GAC CCT GTA TTA CAA GAT ATA AAA GTA GAT GCA ACT Asp Val Lys Lys Asp Pro Val Leu Gln Asp Ile Lys Val Asp Ala Thr 470 475 480	1536	30
TCT GTT AAA CTT TCC GAT GAA GCT GTT GGC GGC GGC GAA GTT GAA GGA Ser Val Lys Leu Ser Asp Glu Ala Val Gly Gly Gly Glu Val Glu Gly 485 490 495	1584	
GTT AAC CAA AAA ACG ATT AAA GTA AGT GCA GTT GAC CAA TAC GGT AAA Val Asn Gln Lys Thr Ile Lys Val Ser Ala Val Asp Gln Tyr Gly Lys 500 505 510	1632	35
GAA ATT AAA TTT GGT ACA AAA GGT AAA GTT ACT GTT ACA ACT AAT ACA Glu Ile Lys Phe Gly Thr Lys Gly Lys Val Thr Val Thr Thr Asn Thr 515 520 525	1680	40
GAA GCA CTA GTT ATT AAA AAT GTA AAT AGC GAT AAT ACA ATT GAC TTT Glu Gly Leu Val Ile Lys Asn Val Asn Ser Asp Asn Thr Ile Asp Phe 530 535 540 545	1728	45
GAT AGC GGC AAT AGT GCA ACT GAC CAA TTT GTT GTC GTT GCA ACA AAA Asp Ser Gly Asn Ser Ala Thr Asp Gln Phe Val Val Val Ala Thr Lys 550 555 560	1776	
GAC AAA ATT GTC AAT GGT AAA GTA GAA GTT AAA TAT TTC AAA AAT GCT Asp Lys Ile Val Asn Gly Lys Val Glu Val Lys Tyr Phe Lys Asn Ala 565 570 575	1824	50
AGT GAC ACA ACA CCA ACT TCA ACT AAA ACA ATT ACT GTT AAT GTA GTA Ser Asp Thr Thr Pro Thr Ser Thr Lys Thr Ile Thr Val Asn Val Val 580 585 590	1872	55
AAT GTA AAA GCT GAC GCT ACA CCA GTA GGA TTA GAT ATT GTA GCA CCT Asn Val Lys Ala Asp Ala Thr Pro Val Gly Leu Asp Ile Val Ala Pro 595 600 605	1920	60

	TCT	AAA	ATT	GAT	GTA	AAT	GCT	CCA	AAC	ACT	GCT	TCT	ACT	GCA	GAT	GTT	1968
	Ser	Lys	Ile	Asp	Val	Asn	Ala	Pro	Asn	Thr	Ala	Ser	Thr	Ala	Asp	Val	
	610					615					620					625	
5	GAT	TTT	ATA	AAT	TTC	GAA	AGT	GTT	GAG	ATT	TAC	ACA	CTC	GAT	TCA	AAT	2016
	Asp	Phe	Ile	Asn	Phe	Glu	Ser	Val	Glu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Asp	Ser	Asn	
					630					635						640	
10	GGT	AGA	CGT	CAA	AAA	AAA	GTT	ACT	CCA	ACT	GCA	ACT	ACA	CTT	GTA	GGT	2064
	Gly	Arg	Arg	Gln	Lys	Lys	Val	Thr	Pro	Thr	Ala	Thr	Thr	Leu	Val	Gly	
				645					650					655			
15	ACA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	GTT	AAT	GGG	AAT	GTA	TTA	CAA	TTC	AAG	GGG	2112
	Thr	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Asn	Gly	Asn	Val	Leu	Gln	Phe	Lys	Gly	
				660					665				670				
	AAC	GAA	GAA	TTA	ACG	CTA	TCA	ACT	TCT	TCT	AGT	ACA	GGA	AAC	GTA	GAT	2160
	Asn	Glu	Glu	Leu	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Asn	Val	Asp	
		675					680					685					
20	GGA	ACA	GCA	GAA	GGA	ATG	ACA	AAA	CGT	ATT	CCA	GGG	AAA	TAT	ATC	AAC	2208
	Gly	Thr	Ala	Glu	Gly	Met	Thr	Lys	Arg	Ile	Pro	Gly	Lys	Tyr	Ile	Asn	
	690					695					700					705	
25	TCT	GCA	AGT	GTA	CCT	GCC	AGT	GCA	ACA	GTA	GCA	ACA	AGT	CCT	GTT	ACT	2256
	Ser	Ala	Ser	Val	Pro	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Thr	Ser	Pro	Val	Thr	
					710					715					720		
30	GTA	AAG	CTT	AAT	TCA	AGT	GAT	AAT	GAT	TTA	ACA	TTT	GAA	GAA	TTA	ATA	2304
	Val	Lys	Leu	Asn	Ser	Ser	Asp	Asn	Asp	Leu	Thr	Phe	Glu	Glu	Leu	Ile	
				725					730					735			
	TTC	GGT	GTA	ATT	GAC	CCT	ACA	CAA	TTA	GTC	AAA	GAT	GAA	GAC	ATC	AAC	2352
	Phe	Gly	Val	Ile	Asp	Pro	Thr	Gln	Leu	Val	Lys	Asp	Glu	Asp	Ile	Asn	
			740				745						750				
35	GAA	TTT	ATT	GCA	GTT	TCA	AAA	GCG	GCT	AAA	AAT	GAT	GGA	TAT	TTG	TAT	2400
	Glu	Phe	Ile	Ala	Val	Ser	Lys	Ala	Ala	Lys	Asn	Asp	Gly	Tyr	Leu	Tyr	
		755					760					765					
40	AAT	AAA	CCG	CTT	GTA	ACG	GTT	AAA	GAT	GCA	TCA	GGA	AAA	GTT	ATT	CCA	2448
	Asn	Lys	Pro	Leu	Val	Thr	Val	Lys	Asp	Ala	Ser	Gly	Lys	Val	Ile	Pro	
	770					775					780					785	
45	ACA	GGT	GCA	AAT	GTT	TAC	GGT	CTA	AAT	CAT	GAT	GCA	ACT	AAC	GGA	AAC	2496
	Thr	Gly	Ala	Asn	Val	Tyr	Gly	Leu	Asn	His	Asp	Ala	Thr	Asn	Gly	Asn	
					790					795					800		
	ATT	TGG	TTT	GAT	GAG	GAA	CAA	GCT	GGC	TTA	GCT	AAA	AAA	TTT	AGT	GAT	2544
	Ile	Trp	Phe	Asp	Glu	Glu	Gln	Ala	Gly	Leu	Ala	Lys	Lys	Phe	Ser	Asp	
				805					810					815			
50	GTA	CAT	TTT	GAT	GTT	GAT	TTT	TCA	TTA	ACT	AAC	GTT	GTA	AAA	ACT	GGT	2592
	Val	His	Phe	Asp	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Thr	Gly	
				820				825					830				
55	AGC	GGT	ACA	GTT	TCT	TCA	TCG	CCA	TCA	TTA	TCT	GAC	GCA	ATT	CAA	CTT	2640
	Ser	Gly	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Leu	Ser	Asp	Ala	Ile	Gln	Leu	
		835					840					845					
60	ACT	AAT	TCA	GGC	GAT	GCA	GTA	TCG	TTT	ACA	TTA	GTT	ATC	AAA	TCA	ATT	2688
	850					855						860				865	

65

TAT GTT AAA GGC GCA GAT AAA GAT GAT AAT AAC TTA CTT GCA GCC CCT 2736
Tyr Val Lys Gly Ala Asp Lys Asp Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Pro
870 875 880

GTT TCT GTC AAT GTG ACT GTG ACA AAA TAA 2766 5
Val Ser Val Asn Val Thr Val Thr Lys
885 890

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6: 10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 921 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear 15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Ala Tyr Gln Pro Lys Ser Phe Arg Lys Phe Val Ala Thr Thr Ala 20
-31 -30 -25 -20

Thr Ala Ala Ile Val Ala Ser Ala Val Ala Pro Val Val Ser Ala Ala
-15 -10 -5 1

Ser Phe Thr Asp Val Ala Pro Gln Tyr Lys Asp Ala Ile Asp Phe Leu 25
5 10 15

Val Ser Thr Gly Ala Thr Lys Gly Lys Thr Glu Thr Lys Phe Gly Val
20 25 30

Tyr Asp Glu Ile Thr Arg Leu Asp Ala Ala Val Ile Leu Ala Arg Val 30
35 40 45

Leu Lys Leu Asp Val Asp Asn Ala Lys Asp Ala Gly Phe Thr Asp Val 35
50 55 60 65

Pro Lys Asp Arg Ala Lys Tyr Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Gly Val
70 75 80

Leu Asn Gly Lys Ala Pro Gly Lys Phe Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Thr 40
85 90 95

Arg Val Glu Met Ala Lys Ile Ile Ala Asn Arg Tyr Lys Leu Lys Ala
100 105 110

Asp Asp Val Lys Leu Pro Phe Thr Asp Val Asn Asp Thr Trp Ala Pro 45
115 120 125

Tyr Val Lys Ala Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Thr Lys Arg Leu Lys His
130 135 140 145

Gln Gln Ala Ser Val His Thr Lys Asn Ile Thr Leu Arg Asp Phe Ala 50
150 155 160

Gln Phe Val Tyr Arg Ala Val Asn Ile Asn Ala Val Pro Glu Ile Val
165 170 175

Glu Val Thr Ala Val Asn Ser Thr Thr Val Lys Val Thr Phe Asn Thr
180 185 190

Gln Ile Ala Asp Val Asp Phe Thr Asn Phe Ala Ile Asp Asn Gly Leu 60
195 200 205

65

	Thr Val Thr Lys Ala Thr Leu Ser Arg Asp Lys Lys Ser Val Glu Val	210	215	220	225
5	Val Val Asn Lys Pro Phe Thr Arg Asn Gln Glu Tyr Thr Ile Thr Ala	230	235	240	
	Thr Gly Ile Lys Asn Leu Lys Gly Glu Thr Ala Lys Glu Leu Thr Gly	245	250	255	
10	Lys Phe Val Trp Ser Val Gln Asp Ala Val Thr Val Ala Leu Asn Asn	260	265	270	
	Ser Ser Leu Lys Val Gly Glu Glu Ser Gly Leu Thr Val Lys Asp Gln	275	280	285	
15	Asp Gly Lys Asp Val Val Gly Ala Lys Val Glu Leu Thr Ser Ser Asn	290	295	300	305
20	Thr Asn Ile Val Val Ser Ser Gly Glu Val Ser Val Ser Ala Ala	310	315	320	
	Lys Val Thr Ala Val Lys Pro Gly Thr Ala Asp Val Thr Ala Lys Val	325	330	335	
25	Thr Leu Pro Asp Gly Val Val Leu Thr Asn Thr Phe Lys Val Thr Val	340	345	350	
30	Thr Glu Val Pro Val Gln Val Gln Asn Gln Gly Phe Thr Leu Val Asp	355	360	365	
	Asn Leu Ser Asn Ala Pro Gln Asn Thr Val Ala Phe Asn Lys Ala Glu	370	375	380	385
35	Lys Val Thr Ser Met Phe Ala Gly Glu Thr Lys Thr Val Ala Met Tyr	390	395	400	
	Asp Thr Lys Asn Gly Asp Pro Glu Thr Lys Pro Val Asp Phe Lys Asp	405	410	415	
40	Ala Thr Val Arg Ser Leu Asn Pro Ile Ile Ala Thr Ala Ala Ile Asn	420	425	430	
45	Gly Ser Glu Leu Leu Val Thr Ala Asn Ala Gly Gln Ser Gly Lys Ala	435	440	445	
	Ser Phe Glu Val Thr Leu Lys Asp Asn Thr Lys Arg Thr Phe Thr Val	450	455	460	465
50	Asp Val Lys Lys Asp Pro Val Leu Gln Asp Ile Lys Val Asp Ala Thr	470	475	480	
	Ser Val Lys Leu Ser Asp Glu Ala Val Gly Gly Gly Glu Val Glu Gly	485	490	495	
55	Val Asn Gln Lys Thr Ile Lys Val Ser Ala Val Asp Gln Tyr Gly Lys	500	505	510	
60	Glu Ile Lys Phe Gly Thr Lys Gly Lys Val Thr Val Thr Thr Asn Thr	515	520	525	
	Glu Gly Leu Val Ile Lys Asn Val Asn Ser Asp Asn Thr Ile Asp Phe	530	535	540	545

Asp Ser Gly Asn Ser Ala Thr Asp Gln Phe Val Val Val Ala Thr Lys	
550 555 560	
Asp Lys Ile Val Asn Gly Lys Val Glu Val Lys Tyr Phe Lys Asn Ala	5
565 570 575	
Ser Asp Thr Thr Pro Thr Ser Thr Lys Thr Ile Thr Val Asn Val Val	
580 585 590	
Asn Val Lys Ala Asp Ala Thr Pro Val Gly Leu Asp Ile Val Ala Pro	10
595 600 605	
Ser Lys Ile Asp Val Asn Ala Pro Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asp Val	
610 615 620 625	
Asp Phe Ile Asn Phe Glu Ser Val Glu Ile Tyr Thr Leu Asp Ser Asn	15
630 635 640	
Gly Arg Arg Gln Lys Lys Val Thr Pro Thr Ala Thr Thr Leu Val Gly	
645 650 655	20
Thr Lys Lys Lys Lys Lys Val Asn Gly Asn Val Leu Gln Phe Lys Gly	
660 665 670	
Asn Glu Glu Leu Thr Leu Ser Thr Ser Ser Thr Gly Asn Val Asp	25
675 680 685	
Gly Thr Ala Glu Gly Met Thr Lys Arg Ile Pro Gly Lys Tyr Ile Asn	
690 695 700 705	
Ser Ala Ser Val Pro Ala Ser Ala Thr Val Ala Thr Ser Pro Val Thr	30
710 715 720	
Val Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asn Asp Leu Thr Phe Glu Glu Leu Ile	
725 730 735	35
Phe Gly Val Ile Asp Pro Thr Gln Leu Val Lys Asp Glu Asp Ile Asn	
740 745 750	
Glu Phe Ile Ala Val Ser Lys Ala Ala Lys Asn Asp Gly Tyr Leu Tyr	
755 760 765	40
Asn Lys Pro Leu Val Thr Val Lys Asp Ala Ser Gly Lys Val Ile Pro	
770 775 780 785	
Thr Gly Ala Asn Val Tyr Gly Leu Asn His Asp Ala Thr Asn Gly Asn	45
790 795 800	
Ile Trp Phe Asp Glu Glu Gln Ala Gly Leu Ala Lys Lys Phe Ser Asp	
805 810 815	
Val His Phe Asp Val Asp Phe Ser Leu Thr Asn Val Val Lys Thr Gly	50
820 825 830	
Ser Gly Thr Val Ser Ser Ser Pro Ser Leu Ser Asp Ala Ile Gln Leu	
835 840 845	55
Thr Asn Ser Gly Asp Ala Val Ser Phe Thr Leu Val Ile Lys Ser Ile	
850 855 860 865	
Tyr Val Lys Gly Ala Asp Lys Asp Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Pro	60
870 875 880	

65

Val Ser Val Asn Val Thr Val Thr Lys
885 890

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 498 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

```

CCCATGGACC CGTCCAAGGA CTCCAAAGCT CAGGTTTCTG CAGCCGAAGC TGGTATCACT      60
GGCACCTGGT ATAACCAACT GGGGTCGACT TTCATTGTGA CCGCTGGTGC GGACGGAGCT      120
CTGACTGGCA CCTACGAATC TGCGGTTGGT AACGCAGAAT CCCGCTACGT ACTGACTGGC      180
CGTTATGACT CTGCACCTGC CACCGATGGC TCTGGTACCG CTCTGGGCTG GACTGTGGCT      240
TGGAAAAACA ACTATCGTAA TGCGCACAGC GCCACTACGT GGTCTGGCCA ATACGTTGGC      300
GGTGCTGAGG CTCGTATCAA CACTCAGTGG CTGTTAACAT CCGGCACTAC CGAAGCGAAT      360
GCATGGAAAT CGACACTAGT AGGTCATGAC ACCTTTACCA AAGTTAAGCC TTCTGCTGCT      420
AGCATTGATG CTGCCAAGAA AGCAGGCGTA AACACGGTA ACCCTCTAGA CGCTGTTTCTG      480
CAATAATAAG GATCCGGG                                     498

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

```

TTCATCGTAA ACGCCGAATT TTGTTTCTG      29

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

```

AGGGAAATAT ATCAACTCTG CAAGTG      26

```

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von S-Layer-Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man

- (a) eine gram-negative prokaryontische Wirtszelle bereitstellt, die transformiert ist mit einer für ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure, ausgewählt aus
 - (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis Position 3684 in SEQ ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
 - (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
 - (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt;
 - (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen und
 - (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle gewinnt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man eine E. coli-Wirtszelle verwendet.
 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das Polypeptid in Form einer assemblierten S-Layer-Struktur aus dem Inneren der Wirtszelle gewinnt.
 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure eine oder mehrere Insertionen enthält, die für Peptid- oder Polypeptidsequenzen kodieren.
 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen ausgewählt werden aus Nukleotidsequenzen, die für Cysteinreste, Bereiche mit mehreren geladenen Aminosäuren oder Tyr-Resten, DNA-bindende Epitope, metallbindende Epitope, immunogene Epitope, allergene Epitope, antigene Epitope, Streptavidin, Enzyme, Cytokine oder Antikörper-bindende Proteine kodieren.
 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für Streptavidin kodieren.
 7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für immunogene Epitope aus Herpesviren, insbesondere Herpesvirus 6 oder FMDV, kodieren.
 8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für Enzyme, wie etwa Polyhydroxybuttersäuresynthase oder bakterielle Luciferase, kodieren.
 9. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für Cytokine, wie etwa Interleukine, Interferone oder Tumornekrosefaktoren, kodieren.
 10. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für Antikörper-bindende Proteine, wie etwa Protein A oder Protein G, kodieren.
 11. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für antigene Epitope kodieren, die an Cytokine oder Endotoxine binden.
 12. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für metallbindende Epitope kodieren.
 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß 5'-seitig der für das S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure in operativer Verknüpfung eine für ein grampositives Signalpeptid kodierende Nukleinsäure angeordnet ist.
 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Signalpeptid kodierende Nukleinsäure
 - (a) den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Nukleotidsequenz,
 - (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder/und
 - (c) eine zu den Sequenzen aus (a) oder/und (b) mindestens 80% homologe Nukleotidsequenz umfaßt.
 15. Nukleinsäure, die für ein rekombinantes S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus
 - (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
 - (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
 - (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt,wobei die Nukleinsäure innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält.
 16. Nukleinsäure nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionsstelle an Position 582, 878, 917, 2504 oder/und 2649 der in SEQ ID No. 1 gezeigten Nukleotidsequenz lokalisiert ist.
 17. Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16 enthält.
 18. Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16 oder einem Vektor nach Anspruch 17 transformiert ist.
 19. Zelle nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine gram-negative prokaryontische Zelle, insbesondere eine E. coli-Zelle ist.
 20. Rekombinantes S-Layer-Protein, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16 kodiert ist.
 21. Rekombinante S-Layer-Struktur, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Untereinheit mindestens ein Protein nach Anspruch 20 enthält.
 22. S-Layer-Struktur nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie weiterhin als Untereinheit mindestens ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein enthält.
 23. S-Layer-Struktur nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie mehrere kovalent oder durch Affinitätsbindung miteinander verknüpfte Schichten umfaßt.

24. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 20 oder einer S-Layer-Struktur nach einem der Ansprüche 21 bis 23 als Vakzin oder Adjuvans.
25. Verwendung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Vakzin oder Adjuvans weiterhin einen Bakterienghost umfaßt, der gegebenenfalls in seiner Membran weitere immunogene Epitope enthält.
26. Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus
- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
 - (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
 - (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.
27. Nukleinsäure nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß sie innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält.
28. Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 26 oder 27 enthält.
29. Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 26 oder 27 oder einem Vektor nach Anspruch 28 transformiert ist.
30. S-Layer-Protein, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer Nukleinsäure nach Anspruch 27 kodiert ist.
31. Rekombinante S-Layer-Struktur, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Untereinheit mindestens ein rekombinantes S-Layer-Protein enthält, das von einer Nukleinsäure nach Anspruch 27 kodiert ist.
32. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 30 oder einer S-Layer-Struktur nach Anspruch 31 als Vakzin oder Adjuvans.
33. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten S-Layer-Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man
- (a) eine Wirtszelle bereitstellt, die eine für ein S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure enthält, die innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält,
 - (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen, und
 - (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle oder dem Kulturmedium gewinnt.
34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ausgewählt wird aus
- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
 - (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
 - (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.
35. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ausgewählt wird aus
- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
 - (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
 - (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 33—35, dadurch gekennzeichnet, daß in der Wirtszelle ein weiteres S-Layer-Gen exprimiert wird, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert.
37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß das nichtmodifizierte S-Layer-Protein in der Lage ist, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 33—35, dadurch gekennzeichnet, daß in der Wirtszelle kein weiteres S-Layer-Gen exprimiert wird, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert, welches in der Lage ist, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden.
39. Verfahren nach einem der Ansprüche 33—38, dadurch gekennzeichnet, daß man eine prokaryontische Wirtszelle verwendet.
40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß man eine gram-positive Wirtszelle verwendet.
41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, daß man *B.stearothermophilus* verwendet.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1

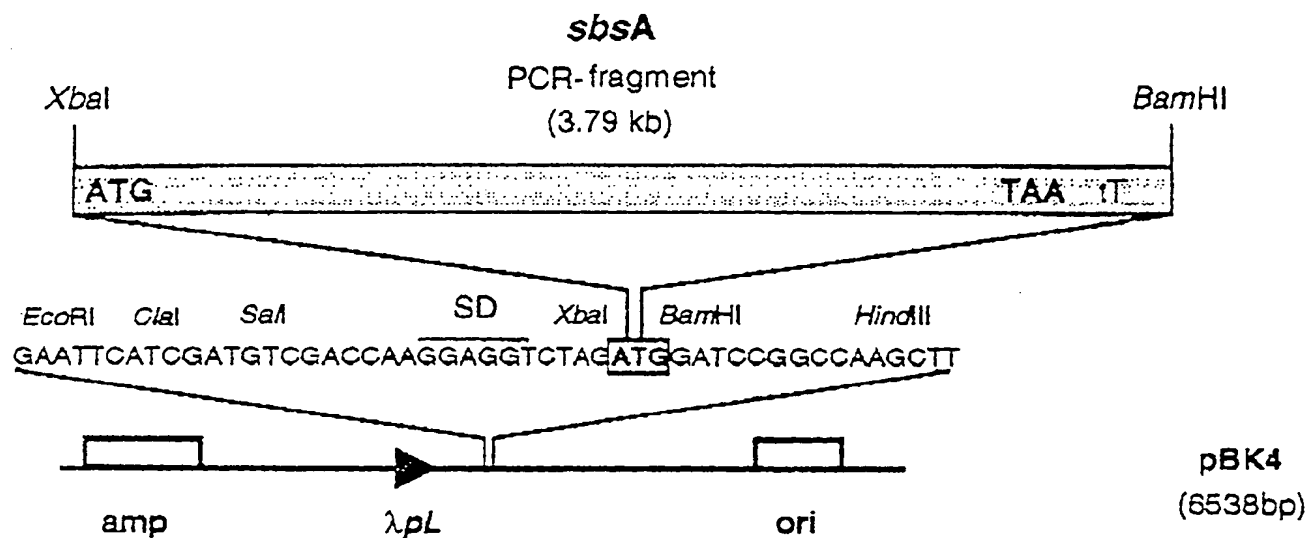


Fig. 2

A)



B)

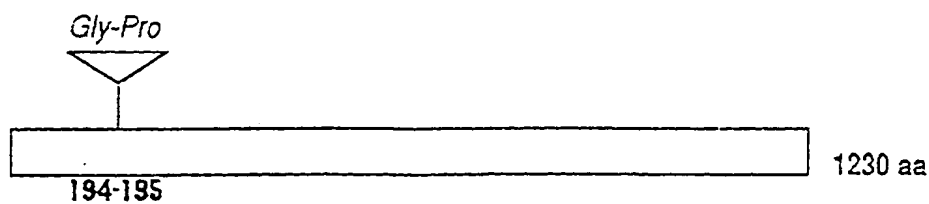


C)

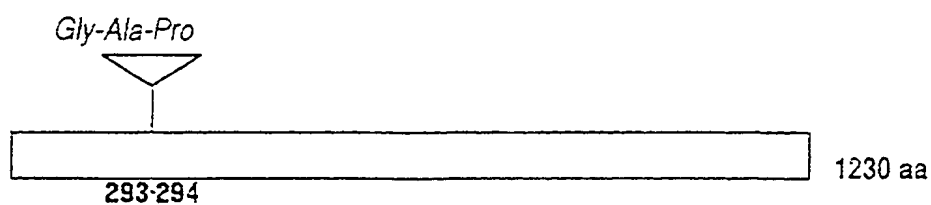


Fig. 3

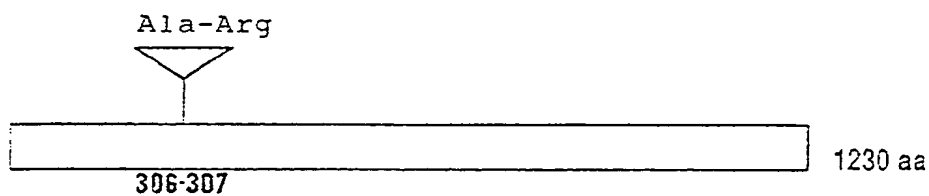
A)



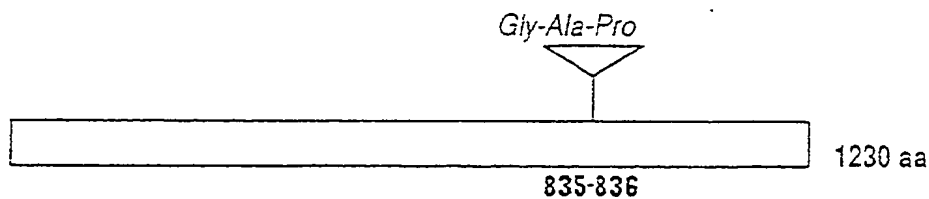
B)



C)



D)



E)

